

(19)



Евразийское
патентное
ведомство

(21) 202392330 (13) A1

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ЕВРАЗИЙСКОЙ ЗАЯВКЕ

(43) Дата публикации заявки
2024.01.11(22) Дата подачи заявки
2022.03.21(51) Int. Cl. C07C 233/23 (2006.01)
C07C 233/60 (2006.01)
C07C 235/40 (2006.01)
C07C 323/60 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01)
A61K 31/16 (2006.01)

(54) ЦИКЛОПРОПАНОВЫЕ АНАЛОГИ N-(ТРАНС-4-ГИДРОКСИЦИКЛОГЕКСИЛ)-6-ФЕНИЛГЕКСАМИДА И РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ

(31) 63/163,392

(32) 2021.03.19

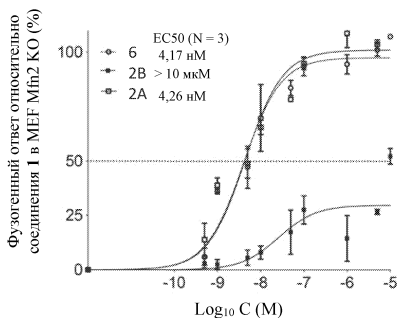
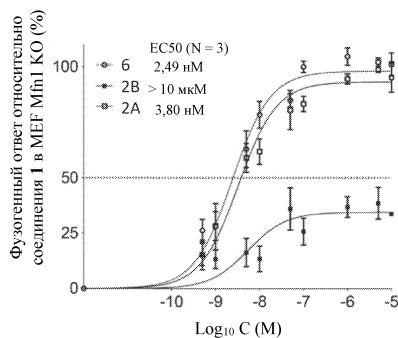
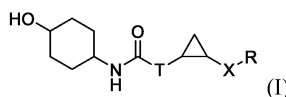
(33) US

(86) PCT/US2022/021210

(87) WO 2022/198139 2022.09.22

(71) Заявитель:
МИТОХОНДРИЯ ЭМОУШН, ИНК.
(US)(72) Изобретатель:
Дорн Джеральд У. (US)(74) Представитель:
Билык А.В., Поликарпов А.В.,
Соколова М.В., Путинцев А.И.,
Черкас Д.А., Игнатьев А.В., Дмитриев
А.В., Бучака С.М., Бельтюкова М.В.
(RU)

(57) Настоящее изобретение относится к соединениям формулы (I): (I), или их фармацевтически приемлемым солям. Настоящее изобретение также относится к путям применения соединений, например, в лечении или предупреждении заболеваний, нарушений или состояний (например, ассоциированных с митохондриями).



A1

202392330

202392330

A1

**ЦИКЛОПРОПАНОВЫЕ АНАЛОГИ N-(ТРАНС-4-
ГИДРОКСИЦИКЛОГЕКСИЛ)-6-ФЕНИЛГЕКСАНАМИДА И
РОДСТВЕННЫХ СОЕДИНЕНИЙ**

РОДСТВЕННЫЕ ЗАЯВКИ

[0001] Настоящая заявка испрашивает приоритет на основании предварительной заявки на патент США № 63/163392, поданной 19 марта 2021 г., которая включена в данный документ посредством ссылки во всей своей полноте.

УРОВЕНЬ ТЕХНИКИ

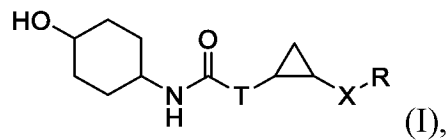
[0002] Митохондриальная дисфункция может способствовать развитию различных типов нейродегенеративных заболеваний. В связи с этим дефектное слияние или деление митохондрий может быть особенно проблематичным, особенно когда несбалансированное слияние и деление приводит к фрагментации митохондрий. Ко множеству нейродегенеративных заболеваний, в которые была вовлечена митохондриальная дисфункция, относятся, например, болезнь Шарко-Мари-Тута, боковой амиотрофический склероз (ALS) и болезнь Хантингтона.

[0003] Слияние митохондрий инициируется с помощью белков митофузинов (MFN), встроенных в наружную мембрану митохондрий, домены которых, расположенные вне органеллы, простираются через цитозольное пространство, взаимодействуя с их аналогами на соседних митохондриях. Физически связанные органеллы образуют олигомеры различных размеров. Митофузины затем индуцируют слияние наружных мембран митохондрий, опосредованное каталитической GTPазой. Считается, что aberrантная активность митофузинов вносит основной вклад в развитие нейродегенеративных заболеваний, связанных с митохондриями. В силу этих причин митофузины являются привлекательными мишенями для изыскания новых лекарственных средств.

[0004] Остается потребность в новых соединениях, которые нацеливаются на митофузины. Настоящее изобретение удовлетворяет данную потребность.

СУЩНОСТЬ ИЗОБРЕТЕНИЯ

[0005] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описано соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемая соль, где

T отсутствует или представляет собой C₁-C₅алкилен или 1-5-членный гетероалкилен, где C₁-C₅алкилен или 1-5-членный гетероалкилен необязательно замещен одним или более R^T;

каждый R^T независимо представляет собой галоген, циано, -OR^{T1}, -N(R^{T1})₂ или C₃-C₁₀циклоалкил; или два R^T вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют C₃-C₁₀циклоалкил или 3-10-членный гетероциклоалкил;

каждый R^{T1} независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил;

X представляет собой C₂-C₅алкилен или 2-5-членный гетероалкилен, где C₂-C₅алкилен или 2-5-членный гетероалкилен необязательно замещен одним или более R^X;

каждый R^X независимо представляет собой галоген, циано, -OR^{X1}, -N(R^{X1})₂ или C₃-C₁₀циклоалкил; или два R^X вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют C₃-C₁₀циклоалкил или 3-10-членный гетероциклоалкил;

каждый R^{X1} независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил;

R представляет собой C₆-C₁₀арил или 5-10-членный гетероарил, где C₆-C₁₀арил или 5-10-членный гетероарил необязательно замещен одним или более из галогена, циано, -OR^S, -N(R^S)₂ или C₃-C₁₀циклоалкила; и

каждый R^S независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил.

[0006] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрено изотопное производное соединения, описанного в данном документе.

[0007] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения соединения, описанного в данном документе.

[0008] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описана фармацевтическая композиция, содержащая любое соединение, описанное в данном документе, и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[0009] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описан способ лечения заболеваний, нарушений или состояний, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, любого соединения, описанного в данном документе, в фармацевтической композиции.

[0010] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описано любое соединение, описанное в данном документе, в фармацевтической композиции для применения для лечения заболеваний, нарушений или состояний, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом.

[0011] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описано применение любого соединения, описанного в данном документе, в фармацевтической композиции в изготовлении лекарственного препарата для лечения заболеваний, нарушений или состояний, включающее введение субъекту, нуждающемуся в этом.

[0012] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описан способ активации митофузина у субъекта, включающий введение соединения или фармацевтической композиции согласно любому из предыдущих пунктов.

[0013] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описано любое соединение, описанное в данном документе, в фармацевтической композиции для применения в активации митофузина у субъекта.

[0014] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описано применение любого соединения, описанного в данном документе, в фармацевтической композиции в изготовлении лекарственного препарата для активации митофузина у субъекта.

[0015] Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее изобретение. В настоящем описании формы единственного числа также включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Хотя способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут применяться при реализации на практике или при тестировании настоящего изобретения, подходящие способы и материалы описаны ниже. Все публикации, заявки на патенты, патенты и другие литературные

источники, упомянутые в данном документе, включены посредством ссылки. Литературные источники, цитируемые в данном документе, не признаются в качестве предшествующего уровня техники по отношению к заявляемому изобретению. В случае противоречий преимущественную силу будет иметь настоящее описание, включая определения. Кроме того, материалы, способы и примеры носят исключительно иллюстративный характер и не предназначены для ограничения. В случае противоречий между химическими структурами и названиями соединений, раскрытых в данном документе, химические структуры будут иметь преимущественную силу.

[0016] Другие признаки и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из следующего подробного описания и формулы изобретения.

КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ГРАФИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ

[0017] Следующие фигуры включены для иллюстрации определенных аспектов настоящего изобретения и не должны рассматриваться как исключительные варианты осуществления. Раскрытый объект настоящего изобретения допускает значительные модификации, изменения, комбинации и эквиваленты по форме и функциям, которые могут прийти на ум специалисту средней квалификации в данной области, использующему преимущества настоящего изобретения.

[0018] На фиг. 1 показана иллюстративная хроматограмма HPLC хирального разделения соединений 2A и 2B.

[0019] На фиг. 2A и 2B показаны иллюстративные кривые дозозависимого эффекта для соединений 2A и 2B в сравнении с соединением 6 в отношении активности против MEF с нокаутом MFN1 и MEF с нокаутом MFN2.

[0020] На фиг. 3A и 3B показаны соответствующие иллюстративные графики соотношения размеров митохондрий, полученного в присутствии соединений 2A и 2B, в сравнении с соединением 6 и DMSO в качестве среды-носителя.

[0021] На фиг. 4 показаны кривые дозозависимого эффекта для соединений 4A и 4B в сравнении с соединением 1 в отношении активности против MEF с нокаутом MFN2.

[0022] Фиг. 5 представляет собой иллюстративную рентгеновскую порошковую дифрактограмму для соединений 4А и 4В.

[0023] На фиг. 6А и 6В показаны иллюстративные изображения кристаллов соединений 4А и 4В, полученные посредством микроскопии в поляризованном свете.

[0024] На фиг. 7А и 7В показаны диаграммы ORTEP, на которых представлены рентгеновские кристаллографические структуры монокристаллов соединений 4А и 4В соответственно.

[0025] На фиг. 8 показана схема упаковки для соединения 4А.

[0026] На фиг. 9 показаны данные рентгеновской порошковой дифракции для полученного микрокристаллического соединения 4А в сравнении с моделированными данными рентгеновской порошковой дифракции, полученными из данных рентгеновской кристаллографии монокристаллов соединения 4А.

[0027] На фиг. 10А показано количество митохондрий в седалищном нерве. На фиг. 10В показана площадь митохондрий у аксональных митохондрий. На фиг. 10С показаны уровни ROS в седалищном нерве, измеренные с помощью 4-HNE.

[0028] На фиг. 11А показана площадь аксонов седалищного нерва. На фиг. 11В показаны поврежденные аксоны в седалищном нерве. На фиг. 11С показаны демиелинизированные аксоны в седалищном нерве. На фиг. 11D показаны апоптозные нейроны в спинном мозге.

[0029] На фиг. 12А показаны количественные данные касательно пиксельной интенсивности COXIV/AchR. Нейромышечные соединения икроножной мышцы метили с помощью антител к ацетилхолиновому рецептору (AchR) и митохондриальной цитохромоксидазе (COX).

[0030] На фиг. 12В показаны количественные данные касательно сниженной площади и центрального расположения ядра. Окрашенные агглютинином зародышей пшеницы (WGA) срезы икроножной мышцы демонстрируют атрофию миоцитов и центральное расположение ядра.

[0031] На фиг. 12С показана интенсивность окрашивания срезов икроножной мышцы для выявления ROS с помощью 4-HNE.

[0032] На фиг. 12D показаны формы активности сукцинатдегидрогеназы (SDH)/цитохромоксидазы (COX) в миоцитах икроножной мышцы. Среднее значение \pm SEM; * = $p < 0,05$ по сравнению с нормальным контролем дикого типа (WT); # = $p < 0,05$ по сравнению с ALS с обработкой с помощью среды-носителя (ALS) согласно ANOVA.

[0033] На фиг. 13A показаны нейроны DRG мышей с SOD1 G93A, окрашенные для выявления митохондрий и митохондриальных ROS. На фиг. 13B—C показаны количественные данные в отношении окрашивания методом TUNEL для выявления апоптоза и окрашивания с помощью йодида пропидия для выявления некроза. На фиг. 13D и 13E показаны количественные данные для митохондрий в отростках нейронов DRG. На фиг. 13F показаны результаты исследований потребления кислорода на Seahorse в перепрограммированных нейронах с SOD1 I113T при ALS. На вставке показано ATP-связанное дыхание. Данные представляют собой среднее значение \pm SEM; * = $p < 0,05$ по сравнению с нормальным контролем дикого типа (WT); # = $p < 0,05$ по сравнению с ALS с обработкой с помощью DMSO согласно ANOVA.

[0034] Фиг. 14 представляет собой график, на котором показана активность изменения MFN2 у иллюстративных соединений. На графике показаны результаты исследований методом FRET, в которых сравниваются формы активности изменения конформации MFN2 у являющихся прототипами активаторов 1 и 2 митофузина и соединений №№ 2A и 2B (при этом все соединения добавлены в конечной концентрации, составляющей 1 мкМ; анализы проводили через 4 ч.). Анализы методом FRET проводили на выделенных митохондриях, при этом оценки удлинения митохондрий проводили в интактных клетках.

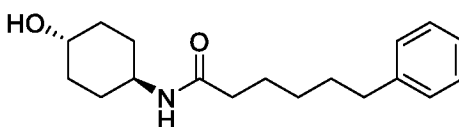
[0035] Фиг. 15A — 15G представляют собой набор графиков, на которых показаны фармакодинамические и терапевтические эффекты 5 в сравнении с 2 у мышей с ALS. На фиг. 15A показаны иллюстративные кимограммы для мышей дикого типа (WT) и мышей SOD1G93A с ALS (ALS) через 12 ч. после перорального введения соединения 2 или среды-носителя. На фиг. 15B показаны зависимые от времени фармакокинетические/фармакодинамические параметры соединения 2 после введения однократных пероральных доз (60 мг/кг); кривая линия данных и левая вертикальная ось показывают подвижность митохондрий

после 5 в аксонах седалищного нерва у мышей с ALS. На фиг. 15C показаны зависимые от времени фармакокинетические/фармакодинамические параметры соединения 1 после введения однократных пероральных доз (60 мг/кг); кривая линия данных и левая вертикальная ось показывают подвижность митохондрий в аксонах седалищного нерва у мышей с СМТ2А. Для фиг. 15B и 15C каждая точка представляет единственный аксон нейрона от двух или трех мышей на каждый момент времени. Прямая линия данных и правая вертикальная ось показывают соответствующие уровни в плазме крови ($n = 5$ на каждый момент времени; средние значения \pm SD). Пунктирная линия, обозначенная как «нормальная подвижность», представляет среднее значение для WT; пунктирная линия, обозначенная как «подвижность при ALS», представляет среднее значение для ALS без обработки. На фиг. 15D показаны сравнительные фармакодинамические параметры соединения 2 и соединения 1. На фиг. 15E показаны эффекты соединения 2 и соединения 1 в отношении балла нейромышечной дисфункции (тест ходьбы по перекладине, тест схватывания задними конечностями, анализ походки, кифоз) в исследовании для подтверждения концепции с использованием мышей с ALS. *P*-значения указаны согласно ANOVA.

ПОДРОБНОЕ ОПИСАНИЕ

[0036] Не ограничиваясь теорией, следует понимать, что соединения, раскрытые в данном документе, могут быть эффективными в активации митофузина. Таким образом, соединения могут быть применимы для лечения различных заболеваний и нарушений, в том числе заболеваний, нарушений или состояний, ассоциированных с митохондриями.

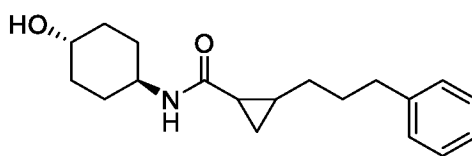
[0037] Различные N-(циклоалкил- или гетероциклоалкил)-6-фенилгексанамидные соединения могут являться сильнодействующими активаторами митофузина (публикация заявки на патент США 2020/0345669). N-(*транс*-4-гидроксициклогексил)-6-фенилгексанамид (соединение 1) может являться особенно сильнодействующим примером активатора митофузина (публикация заявки на патент США 2020/0345668).



Соединение 1

N-(*транс*-4-гидроксициклогексил)-6-фенилгексанамида

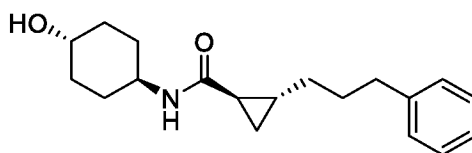
[0038] Было установлено, что путем введения жесткости в метиленовую цепь, проходящую между карбонилем амида и фенильным кольцом соединения 1, могут быть в значительной степени улучшены период полужизни в плазме крови и неврологическая биодоступность. Особенно эффективный активатор митофузина может быть получен путем конденсации двух метиленовых групп, смежных по отношению к карбонилу амида, вместе в виде циклопропильной группы (циклопропанового кольца), структура которого показана в соединении 2.



Соединение 2

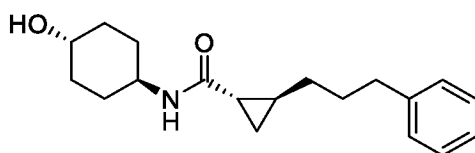
N-((1*r*,4*r*)-4-гидроксициклогексил)-2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксамид

[0039] Было дополнительно установлено, что конкретные стереоизомерные конфигурации циклопропанового кольца обеспечивали сохранение активности в отношении активации митофузина. В частности, (R,R)-конфигурация соединения 2 является активной в отношении содействия активации митофузина, тогда как соответствующая (S,S)-конфигурация соединения 2 является неактивной. Эти соединения представлены структурами, показанными в соединениях 2А и 2В ниже.



Соединение 2А

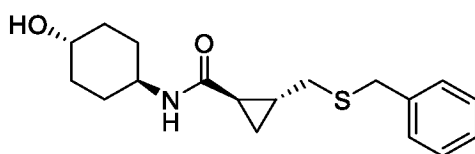
(1*R*,2*R*)-N-((1*r*,4*R*)-4-гидроксициклогексил)-2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксамид



Соединение 2В

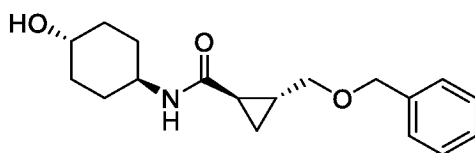
(1S,2S)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)-2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксамид

[0040] Соединения по настоящему изобретению также включают соединения 4А, 5А, 4В и 5В.



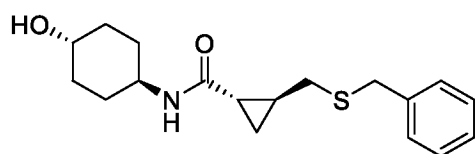
Соединение 4А

(1R,2R)-2-((бензилтио)метил)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)циклопропан-1-карбоксамид



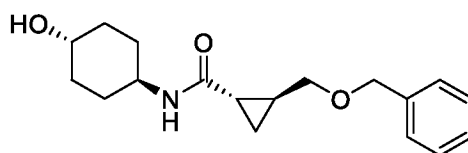
Соединение 5А

(1R,2R)-2-((бензилокси)метил)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)циклопропан-1-карбоксамид



Соединение 4В

(1S,2S)-2-((бензилтио)метил)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)циклопропан-1-карбоксамид



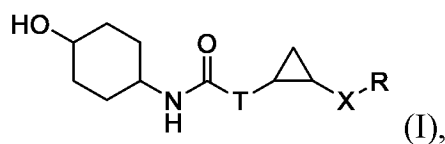
Соединение 5В

(1S,2S)-2-((бензилокси)метил)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)циклопропан-1-карбоксамид

Соединения по настоящему изобретению

[0041] Любой структурный признак, описанный в данном документе (например, для любой иллюстративной формулы, описанной в данном документе), может использоваться в комбинации с любым(любыми) другим(другими) структурным(структурными) признаком(признаками), описанными для любой иллюстративной формулы, описанной в данном документе.

[0042] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описано соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемая соль, где

T отсутствует или представляет собой C₁-C₅алкилен или 2-5-членный гетероалкилен, где C₁-C₅алкилен или 1-5-членный гетероалкилен необязательно замещен одним или более R^T;

каждый R^T независимо представляет собой галоген, циано, -OR^{T1}, -N(R^{T1})₂, оксо, C₁-C₁₀алкил или C₃-C₁₀циклоалкил; или два R^T вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют C₃-C₁₀циклоалкил или 3-10-членный гетероциклоалкил;

каждый R^{T1} независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил;

X представляет собой C₂-C₅алкилен или 2-5-членный гетероалкилен, где C₂-C₅алкилен или 2-5-членный гетероалкилен необязательно замещен одним или более R^X;

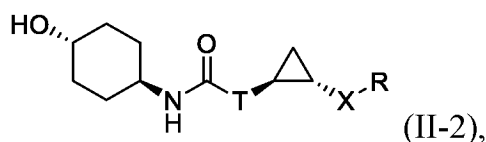
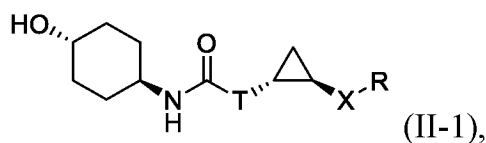
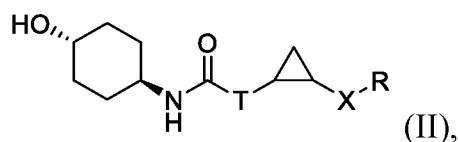
каждый R^X независимо представляет собой галоген, циано, $-OR^{X1}$, $-N(R^{X1})_2$, оксо, C_1-C_{10} алкил или C_3-C_{10} циклоалкил; или два R^X вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют C_3-C_{10} циклоалкил или 3-10-членный гетероциклоалкил;

каждый R^{X1} независимо представляет собой H или C_1-C_6 алкил;

R представляет собой C_6-C_{10} арил или 5-10-членный гетероарил, где C_6-C_{10} арил или 5-10-членный гетероарил необязательно замещен одним или более из галогена, циано, $-OR^S$, $-N(R^S)_2$, C_1-C_{10} алкила или C_3-C_{10} циклоалкила; и

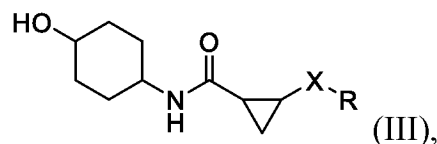
каждый R^S независимо представляет собой H или C_1-C_6 алкил.

[0043] В некоторых вариантах осуществления соединение представлено формулой (II), (II-1) или (II-2):



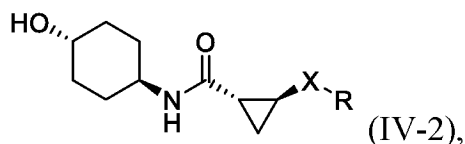
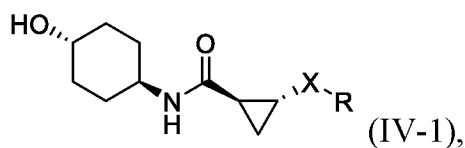
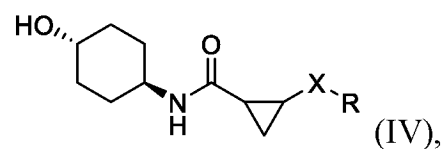
или ее фармацевтически приемлемой солью.

[0044] В некоторых вариантах осуществления соединение представлено формулой (III):



или ее фармацевтически приемлемой солью.

[0045] В некоторых вариантах осуществления соединение представлено формулой (IV), (IV-1) или (IV-2):



или ее фармацевтически приемлемой солью.

[0046] В некоторых вариантах осуществления Т отсутствует.

[0047] В некоторых вариантах осуществления Т представляет собой C₁-C₅алкилен или 2-5-членный гетероалкилен, где C₁-C₅алкилен или 1-5-членный гетероалкилен необязательно замещен одним или более R^T.

[0048] В некоторых вариантах осуществления Т представляет собой C₁-C₅алкилен, необязательно замещенный одним или более R^T.

[0049] В некоторых вариантах осуществления Т представляет собой C₁-C₅алкилен (например, CH₂, (CH₂)₂, (CH₂)₃, (CH₂)₄ или (CH₂)₅).

[0050] В некоторых вариантах осуществления Т представляет собой C₁-C₅алкилен, замещенный одним или более R^T.

[0051] В некоторых вариантах осуществления Т представляет собой 2-5-членный гетероалкилен, необязательно замещенный одним или более R^T.

[0052] В некоторых вариантах осуществления Т представляет собой 2-5-членный гетероалкилен.

[0053] В некоторых вариантах осуществления Т представляет собой 2-5-членный гетероалкилен, содержащий один гетероатом О. В некоторых вариантах осуществления Т представляет собой —CH₂OCH₂CH₂CH₂—*, —CH₂CH₂OCH₂CH₂—*, —CH₂CH₂CH₂OCH₂—*, —CH₂OCH₂CH₂—*, —CH₂CH₂OCH₂—* или —CH₂OCH₂—*, где * обозначает точку присоединения к циклопропилу.

[0054] В некоторых вариантах осуществления T представляет собой 2-5-членный гетероалкилен, содержащий один гетероатом S. В некоторых вариантах осуществления T представляет собой $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ *, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2-$ *, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2-$ *, $-\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2-$ *, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2-$ * или $-\text{CH}_2\text{SCH}_2-$ *, где * обозначает точку присоединения к циклопропилу.

[0055] В некоторых вариантах осуществления T представляет собой 2-5-членный гетероалкилен, содержащий один гетероатом N. В некоторых вариантах осуществления T представляет собой $-\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$ *, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2-$ *, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ *, $-\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2-$ *, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ * или $-\text{CH}_2\text{NCH}_2-$ *, где * обозначает точку присоединения к циклопропилу.

[0056] В некоторых вариантах осуществления T представляет собой 2-5-членный гетероалкилен, замещенный одним или более R^T .

[0057] В некоторых вариантах осуществления каждый R^T независимо представляет собой галоген, циано, $-\text{OR}^{\text{T1}}$, $-\text{N}(\text{R}^{\text{T1}})_2$, оксо, C_1 - C_{10} алкил или C_3 - C_{10} циклоалкил.

[0058] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^T представляет собой галоген.

[0059] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^T представляет собой циано.

[0060] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^T представляет собой $-\text{OR}^{\text{T1}}$ (например, $-\text{OH}$ или $-\text{O}(\text{C}_1\text{-}\text{C}_{10}\text{алкил})$).

[0061] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^T представляет собой $-\text{N}(\text{R}^{\text{T1}})_2$ (например, $-\text{NH}_2$, $-\text{NH}(\text{C}_1\text{-}\text{C}_{10}\text{алкил})$ или $-\text{N}(\text{C}_1\text{-}\text{C}_{10}\text{алкил})_2$).

[0062] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^T представляет собой оксо.

[0063] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^T представляет собой C_3 - C_{10} циклоалкил.

[0064] В некоторых вариантах осуществления два R^T вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют C_3 - C_{10} циклоалкил или 3-10-членный гетероциклоалкил.

[0065] В некоторых вариантах осуществления два R^T вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют C_3 - C_{10} циклоалкил (например, C_3 - C_6 циклоалкил (например, циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил)).

[0066] В некоторых вариантах осуществления два R^T вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют 3-10-членный гетероциклоалкил (например, 4-6-членный гетероциклоалкил (например, тетрагидропиранил)).

[0067] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^{T1} представляет собой H.

[0068] В некоторых вариантах осуществления каждый R^{T1} представляет собой H.

[0069] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^{T1} представляет собой C_1 - C_6 алкил.

[0070] В некоторых вариантах осуществления каждый R^{T1} представляет собой C_1 - C_6 алкил.

[0071] В некоторых вариантах осуществления X представляет собой C_2 - C_5 алкилен, необязательно замещенный одним или более R^X .

[0072] В некоторых вариантах осуществления X представляет собой C_2 - C_5 алкилен (например, $(CH_2)_2$, $(CH_2)_3$, $(CH_2)_4$ или $(CH_2)_5$). В некоторых вариантах осуществления X представляет собой C_2 - C_5 алкилен, замещенный одним или более R^X .

[0073] В некоторых вариантах осуществления X представляет собой 2-5-членный гетероалкилен, необязательно замещенный одним или более R^X .

[0074] В некоторых вариантах осуществления X представляет собой 2-5-членный гетероалкилен, содержащий один гетероатом O. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $-CH_2OCH_2CH_2CH_2-$ *, $-$

$\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{OCH}_2\text{—}^*$ или $\text{—CH}_2\text{OCH}_2\text{—}^*$, где * обозначает точку присоединения к R.

[0075] В некоторых вариантах осуществления X представляет собой 2-5-членный гетероалкилен, содержащий один гетероатом S. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $\text{—CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{SCH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{SCH}_2\text{—}^*$ или $\text{—CH}_2\text{SCH}_2\text{—}^*$, где * обозначает точку присоединения к R.

[0076] В некоторых вариантах осуществления X представляет собой 2-5-членный гетероалкилен, содержащий один гетероатом N. В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $\text{—CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{NCH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{NCH}_2\text{—}^*$ или $\text{—CH}_2\text{NCH}_2\text{—}^*$, где * обозначает точку присоединения к R.

[0077] В некоторых вариантах осуществления X представляет собой 2-5-членный гетероалкилен, замещенный одним или более R^X .

[0078] В некоторых вариантах осуществления X представляет собой $\text{—CH}_2\text{SOCH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{SOCH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SOCH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{SOCH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{SOCH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{SOCH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, $\text{—CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_2\text{—}^*$ или $\text{—CH}_2\text{SO}_2\text{CH}_2\text{—}^*$, где * обозначает точку присоединения к R.

[0079] В некоторых вариантах осуществления каждый R^X независимо представляет собой галоген, циано, —OR^{X1} , $\text{—N(R}^{X1})_2$, оксо, $\text{C}_1\text{—C}_{10}$ алкил или $\text{C}_3\text{—C}_{10}$ циклоалкил.

[0080] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^X представляет собой галоген.

[0081] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^X представляет собой циано.

[0082] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^X представляет собой —OR^{X1} (например, —OH или $\text{—O(C}_1\text{—C}_{10}\text{алкил)}$).

[0083] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^X представляет собой $-N(R^{X1})_2$ (например, $-NH_2$, $-NH(C_1-C_{10}\text{алкил})$ или $-N(C_1-C_{10}\text{алкил})_2$).

[0084] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^X представляет собой оксо.

[0085] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^X представляет собой C_1-C_{10} алкил.

[0086] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^X представляет собой C_3-C_{10} циклоалкил.

[0087] В некоторых вариантах осуществления два R^X вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют C_3-C_{10} циклоалкил или 3-10-членный гетероциклоалкил.

[0088] В некоторых вариантах осуществления два R^X вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют C_3-C_{10} циклоалкил (например, C_3-C_6 циклоалкил (например, циклопропил, циклобутил, циклопентил или циклогексил)).

[0089] В некоторых вариантах осуществления два R^X вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют 3-10-членный гетероциклоалкил (например, 4-6-членный гетероциклоалкил (например, тетрагидропиранил)).

[0090] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^{X1} представляет собой H.

[0091] В некоторых вариантах осуществления каждый R^{X1} представляет собой H.

[0092] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^{X1} представляет собой C_1-C_6 алкил.

[0093] В некоторых вариантах осуществления каждый R^{X1} представляет собой C_1-C_6 алкил.

[0094] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой C₆-C₁₀арил, необязательно замещенный одним или более из галогена, циано, -OR^S, -N(R^S)₂, C₁-C₁₀алкила или C₃-C₁₀циклоалкила.

[0095] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой C₆-C₁₀арил.

[0096] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой C₆-C₁₀арил, замещенный одним или более из галогена, циано, -OR^S, -N(R^S)₂, C₁-C₁₀алкила или C₃-C₁₀циклоалкила.

[0097] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой фенил, необязательно замещенный одним или более из галогена, циано, -OR^S, -N(R^S)₂, C₁-C₁₀алкила или C₃-C₁₀циклоалкила.

[0098] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой фенил.

[0099] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой фенил, замещенный одним или более из галогена, циано, -OR^S, -N(R^S)₂, C₁-C₁₀алкила или C₃-C₁₀циклоалкила.

[00100] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой 5-10-членный гетероарил, необязательно замещенный одним или более из галогена, циано, -OR^S, -N(R^S)₂, C₁-C₁₀алкила или C₃-C₁₀циклоалкила.

[00101] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой 5-10-членный гетероарил.

[00102] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой 5-10-членный гетероарил, замещенный одним или более из галогена, циано, -OR^S, -N(R^S)₂, C₁-C₁₀алкила или C₃-C₁₀циклоалкила.

[00103] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой пиридил, пирозолил, тиазолил, оксазолил или имидазолил, где пиридил, пирозолил, тиазолил, оксазолил или имидазолил необязательно замещен одним или более из галогена, циано, -OR^S, -N(R^S)₂, C₁-C₁₀алкила или C₃-C₁₀циклоалкила.

[00104] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой пиридил, пирозолил, тиазолил, оксазолил или имидазолил.

[00105] В некоторых вариантах осуществления R представляет собой пиридил, пирозолил, тиазолил, оксазолил или имидазолил, где пиридил, пирозолил, тиазолил, оксазолил или имидазолил замещен одним или более из галогена, циано, $-OR^S$, $-N(R^S)_2$, C_1-C_{10} алкила или C_3-C_{10} циклоалкила.

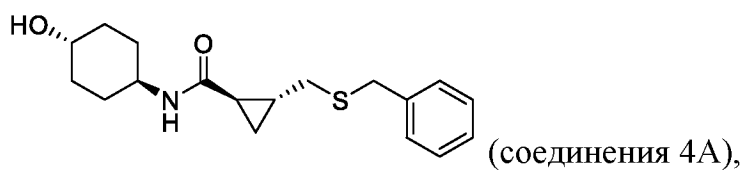
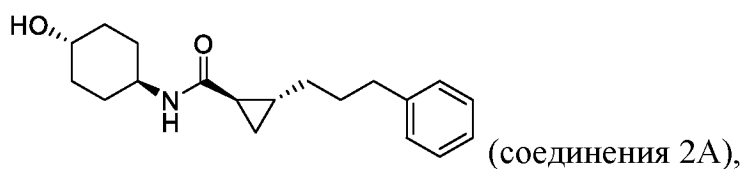
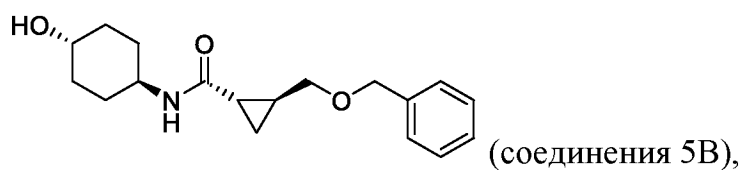
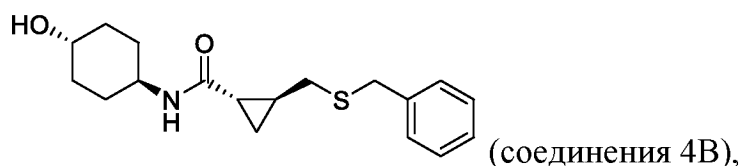
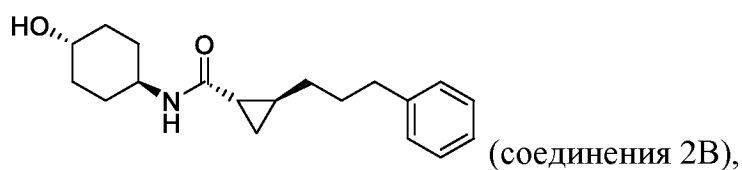
[00106] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^S представляет собой H.

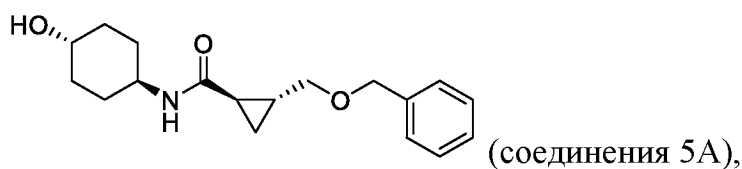
[00107] В некоторых вариантах осуществления каждый R^S представляет собой H.

[00108] В некоторых вариантах осуществления по меньшей мере один R^S представляет собой C_1-C_6 алкил.

[00109] В некоторых вариантах осуществления каждый R^S представляет собой C_1-C_6 алкил.

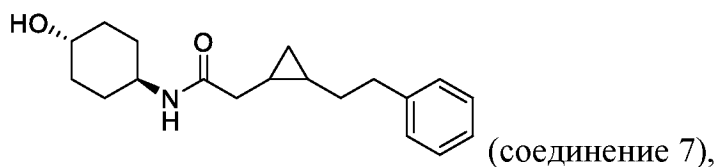
[00110] В некоторых вариантах осуществления соединение выбрано из





и их фармацевтически приемлемых солей.

[00111] В некоторых вариантах осуществления соединение представляет собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

[00112] Следует понимать, что преимущественно стереохимическая транс-конфигурация 4-гидроксициклогексильной группы и стереохимическая (R,R)-конфигурация циклопропанового кольца могут быть установлены перед сборкой активаторов митофузина друг с другом. Таким образом, активаторы митофузина могут демонстрировать высокую стереоизомерную чистоту. В некоторых вариантах осуществления соединение характеризуется молярным соотношением (R,R)-конфигурации и (S,S)-конфигурации циклопропанового кольца, составляющим более 1:1. В некоторых вариантах осуществления соединение характеризуется (R,R)-конфигурацией на приблизительно 60% или больше, или (R,R)-конфигурацией на приблизительно 70% или больше, или (R,R)-конфигурацией на приблизительно 80% или больше, или (R,R)-конфигурацией на приблизительно 90% или больше, или (R,R)-конфигурацией на приблизительно 95% или больше, или (R,R)-конфигурацией на приблизительно 97% или больше, или (R,R)-конфигурацией на приблизительно 99% или больше, или (R,R)-конфигурацией на приблизительно 99,9% или больше. В некоторых вариантах осуществления соединение характеризуется энантимерно чистой (R,R)-конфигурацией циклопропанового кольца.

[00113] В некоторых вариантах осуществления соединение (например, соединение № 2А, 2В, 4А, 4В, 5А или 5В) характеризуется энантимерным избытком («ее»), составляющим приблизительно 10% или больше, ее, составляющим приблизительно 20% или больше, ее, составляющим

приблизительно 30% или больше, ее, составляющим приблизительно 40% или больше, ее, составляющим приблизительно 50% или больше, ее, составляющим приблизительно 60% или больше, ее, составляющим приблизительно 70% или больше, ее, составляющим приблизительно 80% или больше, ее, составляющим приблизительно 90% или больше, ее, составляющим приблизительно 95% или больше, ее, составляющим приблизительно 96% или больше, ее, составляющим приблизительно 97% или больше, ее, составляющим приблизительно 98% или больше, ее, составляющим приблизительно 99% или больше, ее, составляющим приблизительно 99,5% или больше, или ее, составляющим приблизительно 99,9% или больше.

[00114] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрено соединение, представляющее собой изотопное производное (например, изотопно меченное соединение) любого из соединений, раскрытых в данном документе.

[00115] Следует понимать, что изотопное производное может быть получено с применением любой из множества признанных в данной области техники методик. Например, изотопное производное может в целом быть получено путем выполнения процедур, раскрытых на схемах и/или в примерах, описанных в данном документе, путем замещения не меченного изотопами реагента на изотопно меченный реагент.

[00116] В некоторых вариантах осуществления изотопное производное представляет собой меченное дейтерием соединение.

[00117] В некоторых вариантах осуществления изотопное производное представляет собой меченное дейтерием соединение любого из соединений формул, раскрытых в данном документе.

[00118] Следует понимать, что меченное дейтерием соединение содержит атом дейтерия, характеризующийся распространенностью дейтерия, которая существенно превышает природную распространенность дейтерия, составляющую 0,015%.

[00119] В некоторых вариантах осуществления меченное дейтерием соединение характеризуется коэффициентом обогащения дейтерием для каждого атома дейтерия, составляющим по меньшей мере 3500 (52,5% включение дейтерия

по каждому атому дейтерия), по меньшей мере 4000 (60% включение дейтерия), по меньшей мере 4500 (67,5% включение дейтерия), по меньшей мере 5000 (75% дейтерия), по меньшей мере 5500 (82,5% включение дейтерия), по меньшей мере 6000 (90% включение дейтерия), по меньшей мере 6333,3 (95% включение дейтерия), по меньшей мере 6466,7 (97% включение дейтерия), по меньшей мере 6600 (99% включение дейтерия) или по меньшей мере 6633,3 (99,5% включение дейтерия). Используемый в данном документе термин «коэффициент обогащения дейтерием» означает соотношение между распространенностью дейтерия и природной распространенностью дейтерия.

[00120] Следует понимать, что меченное дейтерием соединение может быть получено с применением любой из множества признанных в данной области техники методик. Например, меченное дейтерием соединение может в целом быть получено путем выполнения процедур, раскрытых на схемах и/или в примерах, описанных в данном документе, путем замещения не меченого дейтерием реагента на меченный дейтерием реагент.

[00121] Соединение по настоящему изобретению или его фармацевтически приемлемые соль или сольват, которые содержат вышеупомянутый(вышеупомянутые) атом(атомы) дейтерия, находятся в пределах объема настоящего изобретения. Кроме того, замещение дейтерием (*m. e.* ^2H) может обеспечивать определенные терапевтические преимущества, обусловленные более высокой метаболической стабильностью, например, увеличенный период полужизни *in vivo* или сниженные потребности в дозах.

[00122] Во избежание неоднозначности толкования следует понимать, что, если в настоящем описании группа квалифицируется как «описанная в данном документе», указанная группа охватывает первое встречающееся и наиболее широкое определение, а также все без исключения конкретные определения для этой группы.

[00123] Подходящая фармацевтически приемлемая соль соединения по настоящему изобретению представляет собой, например, соль присоединения кислоты соединения по настоящему изобретению, которая является достаточно основной, например, соль присоединения кислоты с, например, неорганической

или органической кислотой, например, хлористоводородной, бромистоводородной, серной, фосфорной, трифторуксусной, муравьиной, лимонной, метансульфоновой или малеиновой кислотой. Кроме того, подходящая фармацевтически приемлемая соль соединения по настоящему изобретению, которая является достаточно кислой, представляет собой соль щелочного металла, например, натриевую или калиевую соль, соль щелочноземельного металла, например, кальциевую или магниевую соль, аммониевую соль или соль с органическим основанием, из которого образуется фармацевтически приемлемый катион, например, соль с метиламином, диметиламином, диэтиламином, триметиламином, пиперидином, морфолином или трис-(2-гидроксиэтил)амином.

[00124] Будет понятно, что соединения по настоящему изобретению и любые их фармацевтически приемлемые соли включают в себя стереоизомеры, смеси стереоизомеров, полиморфы всех изомерных форм указанных соединений.

[00125] Используемый в данном документе термин «изомерия» означает соединения, которые имеют идентичные молекулярные формулы, но различаются последовательностью связывания их атомов или расположением их атомов в пространстве. Изомеры, которые различаются расположением их атомов в пространстве, называются «стереоизомерами». Стереоизомеры, которые не являются зеркальными отображениями друг друга, называются «диастереоизомерами», и стереоизомеры, которые являются не совпадающими при наложении зеркальными отображениями друг друга, называются «энантиомерами» или иногда оптическими изомерами. Смесь, содержащая равные количества отдельных энантиомерных форм с противоположной хиральностью, называется «рацемической смесью».

[00126] Используемый в данном документе термин «хиральный центр» относится к атому углерода, связанному с четырьмя неидентичными заместителями.

[00127] Используемый в данном документе термин «хиральный изомер» означает соединение с по меньшей мере одним хиральным центром. Соединения с более чем одним хиральным центром могут существовать либо в виде отдельного диастереомера, либо в виде смеси диастереомеров, называемой «диастереомерной

смесью». Если присутствует один хиральный центр, стереоизомер может характеризоваться абсолютной конфигурацией (R или S) этого хирального центра. Абсолютная конфигурация относится к расположению в пространстве заместителей, присоединенных к хиральному центру. Заместители, присоединенные к рассматриваемому хиральному центру, ранжируются в соответствии с *правилом определения последовательности* Кана-Ингольда-Прелога. (Cahn *et al.*, *Angew. Chem. Inter. Edit.* 1966, 5, 385; список опечаток 511; Cahn *et al.*, *Angew. Chem.* 1966, 78, 413; Cahn and Ingold, *J. Chem. Soc.* 1951 (London), 612; Cahn *et al.*, *Experientia* 1956, 12, 81; Cahn, *J. Chem. Educ.* 1964, 41, 116).

[00128] Используемый в данном документе термин «геометрический изомер» означает диастереомеры, существование которых обусловлено затрудненным вращением вокруг двойных связей или циклоалкильного линкера (например, 1,3-циклобутила). Такие конфигурации различаются по их названиям с помощью префиксов цис- и транс- или Z- и E-, которые указывают на то, что группы находятся на одной и той же или противоположных сторонах от двойной связи в молекуле в соответствии с правилами Кана-Ингольда-Прелога.

[00129] Следует понимать, что соединения по настоящему изобретению могут быть изображены в виде разных хиральных изомеров или геометрических изомеров. Также следует понимать, что, если соединения имеют хиральные изомерные или геометрические изомерные формы, все изомерные формы предполагаются как включенные в объем настоящего изобретения, и при наименовании соединений не исключаются какие-либо изомерные формы, при этом следует понимать, что не все изомеры могут характеризоваться одним и тем же уровнем активности.

[00130] Следует понимать, что структуры и другие соединения, обсуждаемые в настоящем изобретении, включают все их атропные изомеры. Также следует понимать, что не все атропные изомеры могут характеризоваться одним и тем же уровнем активности.

[00131] Используемый в данном документе термин «атропные изомеры» означает тип стереоизомера, у которого атомы двух изомеров расположены в

пространстве по-разному. Существование атропных изомеров обусловлено ограниченным вращением вследствие затруднения вращения больших групп вокруг центральной связи. Такие атропные изомеры, как правило, существуют в виде смеси, однако в результате недавних достижений в хроматографических методиках стало возможным разделить смеси двух атропных изомеров в отдельных случаях.

[00132] Используемый в данном документе термин «таутомер» означает один из двух или более структурных изомеров, которые существуют в равновесии и легко превращаются из одной изомерной формы в другую. Данное превращение приводит к формальной миграции атома водорода, сопровождающейся переключением смежных сопряженных двойных связей. Таутомеры существуют в виде смеси набора таутомеров в растворе. В растворах, где возможна таутомеризация, будет достигнуто химическое равновесие таутомеров. Точное соотношение таутомеров зависит от нескольких факторов, в том числе температуры, растворителя и pH. Концепция таутомеров, которые являются взаимопревращаемыми с помощью реакций таутомеризации, называется таутомерией. Из различных типов таутомерии, которые являются возможными, обычно наблюдаются два. При кето-енольной таутомерии происходит одновременный сдвиг электронов и атома водорода. Кольчато-цепная таутомерия возникает в результате осуществления реакции альдегидной группы (-CHO) в молекуле с сахарной цепью с одной из гидроксигрупп (-OH) в той же молекуле с получением циклической (кольцевидной) формы, как проявляется у глюкозы.

[00133] Следует понимать, что соединения по настоящему изобретению могут быть изображены в виде разных таутомеров. Также следует понимать, что, если соединения имеют таутомерные формы, то все таутомерные формы предполагаются как включенные в объем настоящего изобретения, и при наименовании соединений не исключается какая-либо таутомерная форма. Будет понятно, что определенные таутомеры могут характеризоваться более высоким уровнем активности, чем другие.

[00134] Соединения, которые имеют одинаковую молекулярную формулу, но различаются природой или последовательностью связывания их атомов или расположением их атомов в пространстве, называются «изомерами». Изомеры,

которые различаются расположением их атомов в пространстве, называются «стереоизомерами». Стереоизомеры, которые не являются зеркальными отображениями друг друга, называются «диастереомерами», а те, которые являются не совпадающими при наложении зеркальными отображениями друг друга, называются «энантиомерами». Если соединение содержит асимметричный центр, например, он связан с четырьмя разными группами, то возможно существование пары энантиомеров. Энантиомер может характеризоваться абсолютной конфигурацией его асимметричного центра и описываться с помощью правил определения R- и S-последовательности Кана-Прелога или способом, посредством которого молекула вращает плоскость поляризованного света, и обозначаться как правовращающие или левовращающие (т. е. как (+)- или (-)-изомеры соответственно). Хиральное соединение может существовать в виде отдельного энантиомера либо в виде их смеси. Смесь, содержащая равные доли энантиомеров, называется «рацемической смесью».

[00135] Соединения по настоящему изобретению могут обладать одним или более асимметричными центрами; такие соединения могут, следовательно, быть получены в виде отдельных (R)- или (S)-стереоизомеров или в виде их смесей. Если не указано иное, описание или наименование конкретного соединения в описании и формуле изобретения предполагаются как включающие как отдельные энантиомеры, так и их смеси — рацемические или иные. Способы определения стереохимической конфигурации и разделения стереоизомеров хорошо известны из уровня техники (см. обсуждение в главе 4 «Advanced Organic Chemistry», 4th edition J. March, John Wiley and Sons, New York, 2001), например, посредством синтеза из оптически активных исходных материалов или посредством разделения рацемической формы. Некоторые из соединений по настоящему изобретению могут содержать центры геометрической изомерии (E- и Z-изомеры). Следует понимать, что настоящее изобретение охватывает все оптические изомеры, диастереоизомеры и геометрические изомеры и их смеси, которые обладают активностью ингибирования инфламмасом.

[00136] Настоящее изобретение также охватывает соединения по настоящему изобретению, определенные в данном документе, которые содержат одно или более изотопных замещений.

[00137] Следует понимать, что соединения любой формулы, описанные в данном документе, включают сами соединения, а также их соли и их сольваты, если это применимо. Соль, например, может быть образована между анионом и положительно заряженной группой (например, аминогруппой) на замещенном соединении, раскрытом в данном документе. Подходящие анионы включают хлорид, бромид, йодид, сульфат, бисульфат, сульфамат, нитрат, фосфат, цитрат, метансульфонат, трифторацетат, глутамат, глюкуронат, глутарат, малат, малеат, сукцинат, фумарат, тартрат, тозилат, салицилат, лактат, нафталинсульфонат и ацетат (например, трифторацетат).

[00138] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый анион» относится к аниону, подходящему для образования фармацевтически приемлемой соли. Аналогичным образом, соль может также быть образована между катионом и отрицательно заряженной группой (например, карбоксилатом) на замещенном соединении, раскрытом в данном документе. Подходящие катионы включают ион натрия, ион калия, ион магния, ион кальция и катион аммония, такой как ион тетраметиламмония или ион диэтиламина. Замещенные соединения, раскрытые в данном документе, также включают соли, содержащие четвертичные атомы азота.

[00139] Следует понимать, что соединения по настоящему изобретению, например, соли соединений, могут существовать в гидратированной либо негидратированной (безводной) форме или в виде сольватов с молекулами других растворителей. Неограничивающие примеры гидратов включают моногидраты, дигидраты и т. д. Неограничивающие примеры сольватов включают сольваты с этанолом, сольваты с ацетоном и т. д.

[00140] Используемый в данном документе термин «сольват» означает формы присоединения растворителя, которые содержат стехиометрические либо нестехиометрические количества растворителя. Некоторые соединения имеют тенденцию к захвату фиксированного молярного соотношения молекул растворителя в кристаллическое твердое состояние, за счет чего, таким образом, образуется сольват. Если растворитель представляет собой воду, то образованный сольват представляет собой гидрат; и если растворитель представляет собой спирт, то образованный сольват представляет собой алкогольат. Гидраты образуются

путем объединения одной или более молекул воды с одной молекулой вещества, при этом вода сохраняет свое молекулярное состояние в виде H_2O .

[00141] Используемый в данном документе термин «аналог» относится к химическому соединению, которое в структурном отношении сходно с другим, но слегка отличается по составу (как при замене одного атома на атом другого элемента, или в присутствии конкретной функциональной группы, или при замене одной функциональной группы на другую функциональную группу). Таким образом, аналог представляет собой соединение, которое сходно или сравнимо по функции и внешнему виду, но не по структуре или происхождению с эталонным соединением.

[00142] Используемый в данном документе термин «производное» относится к соединениям, которые имеют общую сердцевинную структуру и замещены различными группами, описанными в данном документе.

[00143] Используемый в данном документе термин «биоизостерное соединение» относится к соединению, полученному в результате обмена атома или группы атомов с другими, в широком смысле сходными, атомом или группой атомов. Целью биоизостерной замены является создание нового соединения с биологическими свойствами, сходными со свойствами исходного соединения. Биоизостерная замена может иметь физико-химическую или топологическую основу. Примеры биоизостерных соединений карбоновой кислоты включают без ограничения ацилсульфонамиды, тетразолы, сульфонаты и фосфонаты. См., например, Patani and LaVoie, *Chem. Rev.* 96, 3147-3176, 1996.

[00144] Также следует понимать, что определенные соединения по настоящему изобретению могут существовать в сольватированных, а также в несольватированных формах, таких как, например, гидратированные формы. Подходящий фармацевтически приемлемый сольват представляет собой, например, гидрат, такой как полугидрат, моногидрат, дигидрат или тригидрат.

Синтез соединений

[00145] Следует понимать, что меченное дейтерием соединение может быть получено с применением любой из множества признанных в данной области техники методик. Например, меченное дейтерием соединение может в целом быть

получено путем выполнения процедур, раскрытых на схемах и/или в примерах, описанных в данном документе, путем замещения не меченного дейтерием реагента на меченный дейтерием реагент.

[00146] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения соединения, раскрытого в данном документе.

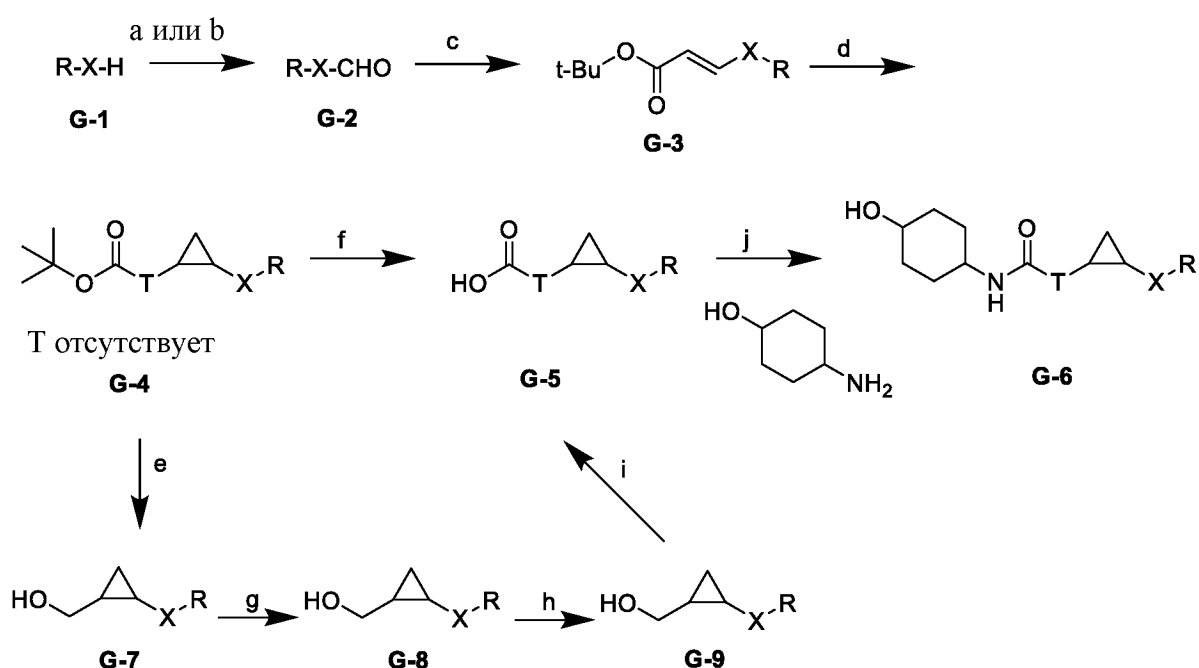
[00147] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрен способ получения соединения, включающий одну или более стадий, описанных в данном документе.

[00148] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрено соединение, получаемое, или полученное, или непосредственно полученное способом получения соединения, описанным в данном документе.

[00149] В некоторых аспектах в настоящем изобретении предусмотрено промежуточное соединение, являющееся подходящим для применения в способе получения соединения, описанного в данном документе.

[00150] В вариантах осуществления соединения, описанное в данном документе, получено в соответствии со схемой 1, представленной ниже.

Схема 1



[00151] В некоторых вариантах осуществления синтеза на схеме 1 проводят с одним или более из следующих реагентов и условий.

Реагенты и условия

(a) оксалилхлорид, диметилсульфоксид (DMSO), триэтиламин (TEA), дихлорметан (DCM), -55-25°C, 20 мин;

(b) (i) EtOH, EtONa, KI;

(ii) 2-хлор-1,1-диметоксиэтан, 80°C, 12 ч; H₂O, H₂SO₄, 60°C, 12 ч;

(c) тетрагидрофуран (THF), 20°C;

(d) NaN, DMSO, 20°C, 1,5 ч;

(e) LiAlH₄, THF, 0-25°C, 3 ч;

(f) TFA, DCM, 25°C, 15 ч;

(g) SOCl₂, TEA, CHCl₃, 0-70°C, 1 ч;

(h) N(nBu)₄CN, THF, 70°C, 12 ч;

(i) KOH, EtOH, H₂O, 100°C, 16 ч;

(j) HOBT, гидрохлорид N-этил-N'-(3-диметиламинопропил)карбодиимида (EDCI), N,N-диизопропилэтиламин (DIEA), DMV, 25°C.

[00152] Соединения по настоящему изобретению могут быть получены посредством любой подходящей методики, известной из уровня техники. Конкретные способы получения таких соединений описаны дополнительно в прилагаемых примерах.

[00153] В описании способов синтеза, описанных в данном документе, и в любых упомянутых способах синтеза, которые применяют для получения исходных материалов, следует понимать, что все предложенные условия реакции, в том числе выбор растворителя, реакционной атмосферы, температуры реакции, продолжительности эксперимента и процедур обработки, могут быть выбраны специалистом в данной области.

[00154] Специалисту в области органического синтеза понятно, что функциональная группа, присутствующая на различных частях молекулы, должна быть совместима с используемыми реагентами и условиями реакции.

[00155] Следует принять во внимание, что в ходе синтеза соединений по настоящему изобретению в способах, определенных в данном документе, или в ходе синтеза определенных исходных материалов может быть желательно защитить определенные замещающие группы для предотвращения их нежелательной реакции. Специалист в области химии поймет, когда требуется такая защита и каким образом такие защитные группы могут быть введены и позже удалены. Примеры защитных групп см. в одном из множества общих текстов по данной теме, например, «Protective Groups in Organic Synthesis», Theodora Green (издатель: John Wiley & Sons). Защитные группы могут быть удалены посредством любого удобного способа, описанного в литературе или известного специалисту в области химии как подходящий для удаления защитной группы, о которой идет речь, при этом такие способы выбраны так, чтобы осуществлять удаление защитной группы с минимальным возмущающим воздействием на группы где-либо еще в молекуле. Таким образом, если реагирующие вещества включают, например, такие группы, как амина, карбокси или гидроксиды, то может быть желательно защитить группу в некоторых из реакций, упомянутых в данном документе.

[00156] Полученные соединения по настоящему изобретению могут быть выделены и очищены с применением методик, хорошо известных из уровня техники.

[00157] Более того, путем использования процедур, описанных в данном документе, в сочетании со средней квалификацией в данной области техники могут быть легко получены дополнительные соединения по настоящему изобретению. Специалисту в данной области будет легко понять, что известные варианты условий и процессов в следующих препаративных процедурах могут использоваться для получения таких соединений.

[00158] Как будет понятно специалисту в области органического синтеза, соединения по настоящему изобретению являются легкодоступными посредством различных путей синтеза, некоторые из которых поясняются в прилагаемых

примерах. Специалисту в данной области будет легко понять, какого типа реагенты и условия реакции должны применяться и каким образом они должны применяться и адаптироваться в любом конкретном случае, где это необходимо или применимо, с целью получения соединений по настоящему изобретению. Кроме того, некоторые из соединений по настоящему изобретению могут легко быть синтезированы путем осуществления реакции других соединений по настоящему изобретению в подходящих условиях, например, путем превращения одной конкретной функциональной группы, присутствующей в соединении по настоящему изобретению или его подходящей молекуле-предшественнике, в другую посредством применения стандартных способов синтеза, таких как реакции восстановления, окисления, присоединения или замещения; эти способы хорошо известны специалисту в данной области. Аналогичным образом, специалист в данной области будет применять, когда это необходимо или применимо, синтетические группы защиты (или защитные группы); подходящие защитные группы, а также способы их введения и удаления, хорошо известны специалисту в области химического синтеза и описанные более подробно в, например, P.G.M. Wuts, T.W. Greene, «Greene's Protective Groups in Organic Synthesis», 4th edition (2006) (John Wiley & Sons).

Биологические анализы

[00159] Можно определить характеристики соединений, разработанных, выбранных и/или оптимизированных посредством способов, описанных выше, после их получения с применением множества анализов, известных специалистам в данной области, для определения того, характеризуются ли соединения биологической активностью. Например, можно определить характеристики молекул посредством традиционных анализов, включая без ограничения анализы, описанные ниже, для определения того, характеризуются ли они прогнозируемой активностью, активностью связывания и/или специфичностью связывания.

[00160] Кроме того, можно применять высокопроизводительный скрининг для ускорения анализа с применением таких анализов. В результате может быть возможным быстрый скрининг молекул, описанных в данном документе, в отношении активности с применением методик, известных из уровня техники. Общие методики проведения высокопроизводительного скрининга описаны,

например, в Devlin (1998) High Throughput Screening, Marcel Dekker; и патенте США № 5763263. В высокопроизводительных анализах можно применять одну или более разных методик анализа, включая без ограничения описанные ниже.

[00161] В некоторых вариантах осуществления биологический анализ включает оценивание дозозависимого эффекта соединения, описанного в данном документе, например, в клетках с дефицитом Mfn1 или Mfn2.

[00162] В некоторых вариантах осуществления биологический анализ включает оценивание форм активности стимуляции митофузина у соединения, описанного в данном документе, например, в клетках, нулевых по Mfn1 или нулевых по Mfn2.

[00163] В некоторых вариантах осуществления биологический анализ проводили с MEF дикого типа (например, полученными из эмбрионов мышей E10.5 c57/bl6).

В некоторых вариантах осуществления биологический анализ проводили с иммортализованными Т-антигеном SV-40 нулевыми по MFN1 (CRL-2992), нулевыми по MFN2 (CRL-2993) и/или двойными нулевыми по MFN1/MFN2 MEF (CRL-2994).

В некоторых вариантах осуществления биологический анализ включает оценивание стабильности *in vitro*, например, в микросомах печени человека и мыши.

В некоторых вариантах осуществления биологический анализ включает параллельный анализ проницаемости искусственной мембраны (PAMPA).

В некоторых вариантах осуществления PAMPA проводят с использованием мембраны из PVDF, например, предварительно покрытой с помощью 5 мкл 1% смеси экстракта полярных липидов головного мозга (свиньи)/додекана.

Фармацевтические композиции

[00164] В другом иллюстративном аспекте в настоящем изобретении описаны фармацевтические композиции, содержащие любое соединение из данного документа или их фармацевтически приемлемую форму. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит терапевтически

эффективное количество любого соединения, описанного в данном документе, или любой его фармацевтически приемлемой формы.

[00165] В некоторых вариантах осуществления фармацевтически приемлемая форма соединения включает любые его фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты, изомеры, пролекарства и изотопно меченные производные.

[00166] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит любое соединение, описанное в данном документе, или его фармацевтически приемлемую соль.

[00167] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция содержит фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[00168] Для целей настоящего изобретения термины «вспомогательное вещество» и «носитель» используются взаимозаменяемо по всему описанию настоящего изобретения, и указанные термины определяются в данном документе как «ингредиенты, которые применяются в практике составления безопасной и эффективной фармацевтической композиции».

[00169] Специалист, занимающийся составлением, поймет, что вспомогательные вещества применяются в основном для содействия доставке безопасного, стабильного и функционального фармацевтического препарата и служат не только в качестве части полной среды-носителя для доставки, но также в качестве средства для достижения эффективной абсорбции активного ингредиента в организме реципиента. Вспомогательное вещество может выполнять такую простую и прямую роль, как инертный наполнитель, или вспомогательное вещество, применяемое в данном документе, может быть частью системы стабилизации pH или покрытия для обеспечения безопасной доставки ингредиентов в желудок. Специалист, занимающийся составлением, может также использовать преимущество того факта, что соединения по настоящему изобретению характеризуются улучшенными действенностью в клетках, фармакокинетическими свойствами, а также улучшенной биодоступностью при пероральном введении.

[00170] Соответственно, в некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены фармацевтические композиции, содержащие одно или более соединений, раскрытых в данном документе, или их фармацевтически приемлемых форм (например, фармацевтически приемлемые соли, гидраты, сольваты, изомеры, пролекарства и изотопно меченные производные) и один или более фармацевтически приемлемых наполнителей, носителей, включая инертные твердые разбавители и заполнители, разбавителей, включая стерильный водный раствор и различные органические растворители, усилителей проницаемости, солюбилизаторов и вспомогательных средств. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция, описанная в данном документе, содержит второе действующее вещество, такое как дополнительное терапевтическое средство (например, химиотерапевтическое средство).

[00171] Соответственно, идеи настоящего изобретения также предусматривают фармацевтические композиции, которые содержат по меньшей мере одно соединение, описанное в данном документе, или любую его фармацевтическую соль и один или более фармацевтически приемлемых носителей, наполнителей или разбавителей. Примеры таких носителей широко известны специалистам в данной области и могут быть получены в соответствии с приемлемыми фармацевтическими процедурами, такими как, например, описанные в Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th edition, ed. Alfonso R. Gennaro, Mack Publishing Company, Easton, PA (1985), полное раскрытие которой включено в данный документ посредством ссылки для всех целей. Как используется в данном документе, «фармацевтически приемлемый» относится к веществу, которое является приемлемым для применения в фармацевтических вариантах применения с токсикологической точки зрения и не вступает в неблагоприятное взаимодействие с активным ингредиентом. Соответственно, фармацевтически приемлемыми носителями являются те, которые являются совместимыми с другими ингредиентами в композиции и являются биологически приемлемыми. Дополнительные активные ингредиенты могут также быть включены в состав фармацевтических композиций.

[00172] Соединения в соответствии с идеями настоящего изобретения можно вводить перорально или парентерально, в чистом виде или в комбинации с традиционными фармацевтическими носителями. Применимые твердые носители могут включать одно или более веществ, которые также могут выступать в качестве ароматизаторов, смазывающих веществ, солюбилизаторов, суспендирующих средств, наполнителей, веществ, способствующих скольжению, добавок для прессования, связывающих средств или разрыхлителей для таблеток или инкапсулирующих материалов. Фармацевтические композиции в форме составов для перорального применения, содержащие соединение, раскрытое в данном документе, могут предусматривать любую традиционно применяемую форму для перорального применения, в том числе таблетки, капсулы, формы для трансбуккального применения, троше, пастилки и жидкости для перорального применения, суспензии или растворы. В порошках носитель может представлять собой тонкоизмельченное твердое вещество, которое представляет собой добавку с тонкоизмельченным соединением. В таблетках соединение, раскрытое в данном документе, может быть смешано с носителем, обладающим необходимыми свойствами прессования, в подходящих пропорциях и спрессовано до желаемых формы и размера. Порошки и таблетки и могут содержать до 99% соединения.

[00173] Капсулы могут содержать смеси одного или более соединений, раскрытых в данном документе, с инертным(инертными) наполнителем(наполнителями) и/или разбавителем(разбавителями), такими как фармацевтически приемлемые крахмалы (например, кукурузный, картофельный или тапиоковый крахмал), сахара, искусственные подсластители, порошкообразные виды целлюлозы (например, кристаллические и микрокристаллические виды целлюлозы), виды муки, виды желатина, камеди и т. п.

[00174] Применимые таблетированные составы могут быть получены путем традиционного прессования, с помощью способов влажной грануляции или сухой грануляции и с использованием фармацевтически приемлемых разбавителей, связывающих средств, смазывающих веществ, разрыхлителей, средств для модификации поверхности (в том числе поверхностно-активных веществ), суспендирующих средств или стабилизаторов, включая без ограничения стеарат

магния, стеариновую кислоту, лаурилсульфат натрия, тальк, сахара, лактозу, декстрин, крахмал, желатин, целлюлозу, метилцеллюлозу, микрокристаллическую целлюлозу, натрий-карбоксиметилцеллюлозу, кальций-карбоксиметилцеллюлозу, поливинилпирролидин, альгиновую кислоту, аравийскую камедь, ксантановую камедь, цитрат натрия, комплексные силикаты, карбонат кальция, глицин, сахарозу, сорбит, фосфат дикальция, сульфат кальция, лактозу, каолин, маннит, хлорид натрия, низкоплавкие воски и ионообменные смолы. Средства для модификации поверхности включают неионогенные и анионные средства для модификации поверхности. Иллюстративные примеры средств для модификации поверхности включают без ограничения полоксамер 188, хлорид бензалкония, стеарат кальция, цетостеариловый спирт, эмульсионный воск цетомакрогол, сложные эфиры сорбитана, коллоидный диоксид кремния, фосфаты, додецилсульфат натрия, алюмосиликат магния и триэтаноламин. В составах для перорального применения, описанных в данном документе, могут использоваться стандартные составы с отсроченным или постоянным высвобождением для изменения абсорбции соединения(соединений). Состав для перорального применения может также состоять из вводимого соединения, раскрытого в данном документе, в воде или фруктовом соке, содержащих подходящие солюбилизаторы или эмульгаторы в случае необходимости.

[00175] Жидкие носители можно применять в получении растворов, суспензий, эмульсий, сиропов, эликсиров и для доставки путем ингаляции. Соединение в соответствии с идеями настоящего изобретения может быть растворено или суспендировано в фармацевтически приемлемом жидком носителе, таком как вода, органический растворитель или смесь их обоих, или в фармацевтически приемлемых маслах или жирах. Жидкий носитель может содержать другие подходящие фармацевтические добавки, такие как солюбилизаторы, эмульгаторы, буферы, консерванты, подсластители, ароматизаторы, суспендирующие средства, загустители, красители, регуляторы вязкости, стабилизаторы и осморегуляторы. Примеры жидких носителей для перорального и парентерального введения включают без ограничения воду (в частности, содержащую добавки, описанные в данном документе, например, производные целлюлозы, такие как раствор натрий-карбоксиметилцеллюлозы),

спирты (в том числе одноатомные спирты и многоатомные спирты, например, гликоли) и их производные и масла (например, фракционированное кокосовое масло и арахисовое масло). Для парентерального введения носитель может представлять собой жирный сложный эфир, такой как этилолеат и изопропилмирилат. Стерильные жидкие носители применяются в стерильных жидких формах композиций для парентерального введения. Жидкий носитель для композиций под давлением может представлять собой галогенированный углеводород или другие фармацевтически приемлемые пропелленты.

[00176] Жидкие фармацевтические композиции, которые представляют собой стерильные растворы или суспензии, можно использовать путем, например, внутримышечной, внутривенной или подкожной инъекции. Стерильные растворы также можно вводить внутривенно. Композиции для перорального введения могут быть представлены в жидкой либо твердой форме.

[00177] В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция представлена в виде стандартной лекарственной формы, например, в виде таблеток, капсул, порошков, растворов, суспензий, эмульсий, гранул или суппозитория. В такой форме фармацевтическая композиция может быть подразделена на одноразовую(одноразовые) дозу(дозы), содержащую(содержащие) подходящие количества соединения. Стандартные лекарственные формы могут представлять собой упакованные композиции, например, упакованные порошки, флаконы, ампулы, предварительно заполненные шприцы или саше, содержащие жидкости. В качестве альтернативы стандартная лекарственная форма может представлять собой капсулу или таблетку как таковую или может представлять собой подходящее количество любых таких композиций в упаковочной форме. Такая стандартная лекарственная форма может содержать от приблизительно 1 мг/кг соединения до приблизительно 500 мг/кг соединения и может предоставляться в виде однократной дозы или в виде двух или более доз. Такие дозы можно вводить любым способом, применимым для направления соединения(соединений) в кровоток реципиента, в том числе перорально, посредством имплантатов, парентерально (в том числе с помощью внутривенных, внутривенных и подкожных инъекций), ректально, вагинально и трансдермально.

[00178] При введении для лечения или подавления конкретного болезненного состояния или нарушения следует понимать, что эффективная доза может варьироваться в зависимости от конкретного используемого соединения, способа введения и тяжести состояния, лечение которого осуществляется, а также различных физических факторов, относящихся к индивидууму, получающему лечение. В терапевтических вариантах применения соединение в соответствии с идеями настоящего изобретения может предоставляться пациенту, уже страдающему заболеванием, в количестве, достаточном для излечения или по меньшей мере частичного уменьшения интенсивности проявлений симптомов заболевания и его осложнений. Доза, которую следует применять в лечении определенного индивидуума, как правило, должна быть субъективно определена лечащим врачом. Вовлеченные переменные включают определенное состояние и его статус, а также габариты, возраст и картину ответа пациента.

[00179] В некоторых случаях может быть желательным введение соединения непосредственно в дыхательные пути пациента с применением устройств, таких как, без ограничения, ингаляторы отмеренных доз, активируемые вдохом ингаляторы, многодозовые ингаляторы сухого порошка, помпы, активируемые нажатием дозаторы для распыления спрея, дозаторы аэрозоля и аэрозольные небулайзеры. Для введения путем интраназальной или внутривибронхиальной ингаляции соединения в соответствии с идеями настоящего изобретения могут быть составлены в виде жидкой композиции, твердой композиции или аэрозольной композиции. Жидкая композиция может содержать в качестве иллюстрации одно или более соединений в соответствии с идеями настоящего изобретения, растворенных, частично растворенных или суспендированных в одном или более фармацевтически приемлемых растворителях, и может вводиться с помощью, например, помпы или активируемого нажатием дозатора для распыления спрея. Растворители могут представлять собой, например, изотонический солевой раствор или бактериостатическую воду. Твердая композиция может представлять собой в качестве иллюстрации порошковый препарат, содержащий одно или более соединений в соответствии с идеями настоящего изобретения, смешанных с лактозой или другими инертными порошками, которые являются приемлемыми

для внутрибронхиального применения, который может вводиться с помощью, например, дозатора аэрозоля или устройства, которое разрушает или прокалывает капсулу, заключающую в себе твердую композицию, и доставляет твердую композицию для ингаляции. Аэрозольная композиция может содержать в качестве иллюстрации одно или более соединений в соответствии с идеями настоящего изобретения, пропелленты, поверхностно-активные вещества и соразтворители и может вводиться с помощью, например, дозирующего устройства. Пропелленты могут представлять собой хлорфторуглерод (CFC), гидрофторалкан (HFA) или другие пропелленты, которые являются физиологически и с точки зрения окружающей среды приемлемыми.

[00180] Соединения, описанные в данном документе, можно вводить парентерально или внутривенно. Растворы или суспензии таких соединений или их фармацевтически приемлемые соли, гидраты или сложные эфиры могут быть получены в воде, надлежащим образом смешанной с поверхностно-активным веществом, таким как гидроксипропилцеллюлоза. Дисперсии могут также быть получены в глицерине, жидких полиэтиленгликолях и их смесях в маслах. В обычных условиях хранения и применения такие препараты, как правило, содержат консервант для подавления роста микроорганизмов.

[00181] Фармацевтические формы, подходящие для инъекции, могут включать стерильные водные растворы или дисперсии и стерильные порошки для экстенпорального получения стерильных инъекционных растворов или дисперсий. В некоторых вариантах осуществления форма может быть стерильной, и ее вязкость позволяет ей течь через шприц. Данная форма предпочтительно является стабильной в условиях изготовления и хранения и может быть предохранена от загрязняющего действия микроорганизмов, таких как бактерии и грибы. Носитель может представлять собой растворитель или дисперсионную среду, содержащие, например, воду, этанол, полиол (например, глицерин, пропиленгликоль и жидкий полиэтиленгликоль), их подходящие смеси и растительные масла.

[00182] Соединения, описанные в данном документе, можно вводить трансдермально, т. е. вводить через поверхность тела и внутренние выстилки каналов в организме, в том числе эпителиальные ткани и ткани слизистой оболочки. Такое введение можно проводить с применением соединений в

соответствии с идеями настоящего изобретения, в том числе их фармацевтически приемлемых солей, гидратов или сложных эфиров, в лосьонах, кремах, пенах, пластырях, суспензиях, растворах и суппозиториях (ректальных и вагинальных).

[00183] Трансдермальное введение можно осуществлять посредством применения трансдермального пластыря, содержащего соединение, такое как соединение, раскрытое в данном документе, и носитель, который может быть инертным в отношении соединения, может быть нетоксичным для кожи и может обеспечивать возможность доставки соединения для системной абсорбции в кровотоки через кожу. Носитель может принимать любое количество форм, таких как кремы и мази, пасты, гели и окклюзионные устройства. Кремы и мази могут представлять собой вязкие жидкие или полутвердые эмульсии типа «масло в воде» либо «вода в масле». Пасты, содержащие абсорбирующие порошки, диспергированные в нефтепродукте или гидрофильном нефтепродукте, содержащем соединение, могут также быть подходящими. Для высвобождения соединения в кровотоки можно применять множество окклюзионных устройств, таких как полупроницаемая мембрана, покрывающая резервуар, содержащий соединение с носителем или без носителя, или матрица, содержащая соединение. Другие окклюзионные устройства известны в литературе.

[00184] Соединения, описанные в данном документе, можно вводить ректально или вагинально в форме традиционного суппозитория. Составы в виде суппозитория могут быть получены из традиционных материалов, в том числе масла какао, с добавлением или без добавления восков для изменения точки плавления суппозитория и глицерина. Также можно применять водорастворимые суппозиторные основы, такие как полиэтиленгликоли с различными значениями молекулярной массы.

[00185] Липидные составы или наночастицы можно применять для введения соединений в соответствии с идеями настоящего изобретения в клетки-хозяева *in vitro* либо *in vivo*. Липидные составы и наночастицы могут быть получены посредством способов, известных из уровня техники.

[00186] Для увеличения эффективности соединений в соответствии с идеями настоящего изобретения может быть желательно объединить соединение с

другими средствами, эффективными в лечении целевого заболевания. Например, другие активные соединения (т. е. другие активные ингредиенты или действующие вещества), эффективные в лечении целевого заболевания, можно вводить с соединениями в соответствии с идеями настоящего изобретения. Другие средства можно вводить в то же время или в другие моменты времени по сравнению с соединениями, раскрытыми в данном документе.

Наборы

[00187] В некоторых вариантах осуществления в данном документе предусмотрены наборы. Наборы могут содержать соединение или его фармацевтически приемлемую форму или фармацевтическую композицию, описанную в данном документе, в подходящей упаковке и письменный материал, который может содержать инструкции по применению, обсуждение клинических исследований, перечень побочных эффектов и т. п. Наборы хорошо подходят для доставки твердых лекарственных форм для перорального применения, таких как таблетки или капсулы. Такие наборы могут также содержать информацию, такую как ссылки на научную литературу, материалы листка-вкладыша, результаты клинических испытаний и/или обобщенное изложение таковых и т. п., которая определяет или устанавливает формы активности и/или преимущества фармацевтической композиции и/или которая описывает дозирование, введение, побочные эффекты, взаимодействия лекарственных средств или другую информацию, применимую для поставщика медицинских услуг. Такая информация может быть основана на результатах различных исследований, например, исследований с использованием экспериментальных животных с включением моделей *in vivo* и исследований на основе клинических испытаний с участием людей.

Способы применения

[00188] Соединения или фармацевтическая композиция в соответствии с идеями настоящего изобретения могут быть применимы для лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, например, у субъекта-человека. Идеи настоящего изобретения соответственно предусматривают способы лечения или предупреждения заболевания, нарушения

или состояния у субъекта путем предоставления субъекту соединения в соответствии с идеями настоящего изобретения (в том числе его фармацевтически приемлемой соли) или фармацевтической композиции, которая содержит одно или более соединений в соответствии с идеями настоящего изобретения в комбинации или ассоциации с фармацевтически приемлемыми носителями. Соединения в соответствии с идеями настоящего изобретения можно вводить по отдельности или в комбинации с другими терапевтически эффективными соединениями или средствами терапии для лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния.

[00189] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описан способ лечения заболеваний, нарушений или состояний, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом, любого соединения, описанного в данном документе, в фармацевтической композиции.

[00190] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описано любое соединение, описанное в данном документе, в фармацевтической композиции для применения для лечения заболеваний, нарушений или состояний, включающий введение субъекту, нуждающемуся в этом.

[00191] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описано применение любого соединения, описанного в данном документе, в фармацевтической композиции в изготовлении лекарственного препарата для лечения заболеваний, нарушений или состояний, включающее введение субъекту, нуждающемуся в этом.

[00192] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описан способ активации митофузина у субъекта, включающий введение соединения или фармацевтической композиции согласно любому из предыдущих пунктов.

[00193] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описано любое соединение, описанное в данном документе, в фармацевтической композиции для применения в активации митофузина у субъекта.

[00194] В некоторых аспектах в настоящем изобретении описано применение любого соединения, описанного в данном документе, в

фармацевтической композиции в изготовлении лекарственного препарата для активации митофузина у субъекта.

[00195] В некоторых вариантах осуществления соединение, описанное в данном документе, или любую его фармацевтически приемлемую форму, такую как его фармацевтически приемлемая соль, можно применять для лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта.

[00196] В некоторых вариантах осуществления субъекту вводится терапевтически эффективное количество соединения или фармацевтической композиции, описанных в данном документе.

[00197] В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние ассоциировано с митохондриями.

[00198] В некоторых вариантах осуществления заболевание, нарушение или состояние представляет собой генетическое или негенетическое нарушение, физическое повреждение или химическое поражение периферической нервной системы (PNS), центральной нервной системы (CNS).

[00199] В некоторых вариантах осуществления нарушение со стороны PNS или CNS представляет собой одно или более состояний, выбранных из группы, состоящей из хронического нейродегенеративного состояния, при котором слияние, приспособленность и/или транспорт митохондрий является/являются нарушенными; заболевания или нарушения, ассоциированного с дисфункцией митофузина 1 (MFN1) или митофузина 2 (MFN2); заболевания, ассоциированного с фрагментацией, дисфункцией и/или нарушением подвижности митохондрий; дегенеративного нейромышечного состояния; болезни Шарко-Мари-Тута; бокового амиотрофического склероза; болезни Хантингтона; болезни Альцгеймера; болезни Паркинсона; наследственной моторно-сенсорной нейропатии; аутизма; аутосомно-доминантной атрофии зрительного нерва (ADOA); мышечной дистрофии; болезни Лу Герига; рака; митохондриальной миопатии; сахарного диабета и глухоты (DAD); наследственной оптической нейропатии Лебера (LHON); синдрома Лея; подострой склерозирующей энцефалопатии; нейропатии, атаксии, пигментного ретинита и птоза (NARP); мионейрогенной желудочно-кишечной энцефалопатии (MNGIE); миоклонической эпилепсии с рваными мышечными волокнами

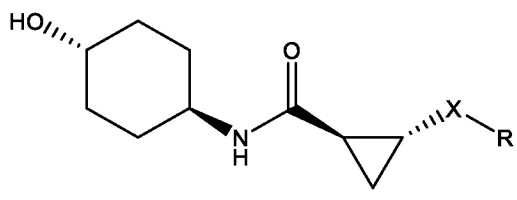
(MERRF); митохондриальной миопатии, энцефаломиопатии, лактатацидоза и инсультоподобных симптомов (MELAS); истощения мтДНК; митохондриальной нейрогастроинтестинальной энцефаломиопатии (MNGIE); дизавтономной митохондриальной миопатии; митохондриальной каналопатии; дефицита пируватдегидрогеназного комплекса (PDCD/PDH); диабетической нейропатии; периферической нейропатии, индуцированной химиотерапией; повреждения с разможением тканей; повреждения спинного мозга (SCI); травматического повреждения головного мозга; инсульта; повреждения зрительного нерва; состояний, которые предусматривают разъединение аксонов; и любой их комбинации.

[00200] В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком.

[00201] В некоторых вариантах осуществления соединение, описанное в данном документе, или любую его фармацевтически приемлемую форму, такую как его фармацевтически приемлемая соль, можно применять для активации митофузина у субъекта (например, человека).

Иллюстративные варианты осуществления

[00202] Иллюстративный вариант осуществления № 1. Композиция, содержащая активатор митофузина, имеющий структуру, представленную с помощью



или его фармацевтически приемлемую соль; где X представляет собой 3-атомную спейсерную группу, и R представляет собой фенил или замещенный фенил.

[00203] Иллюстративный вариант осуществления № 2. Композиция согласно пункту 1, где X представляет собой $-\text{CH}_2\text{YCH}_2-$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Y}-$; где Y представляет собой O, S, SO, SO₂, CR¹R² или NR³; где R¹ и R² независимо выбраны из группы, состоящей из H, F, C₁-C₁₀алкила и C₃-C₁₀циклоалкила, или R¹ и R²,

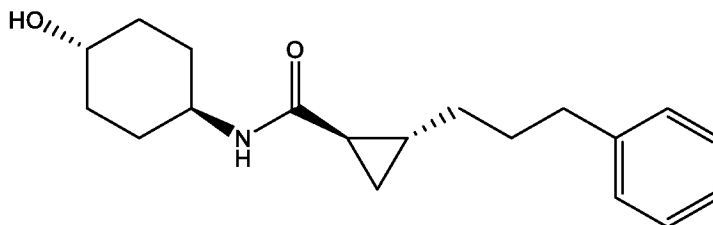
взятые вместе, образуют циклоалкил или гетероциклоалкил; и R^3 представляет собой H, C_1 - C_{10} алкил или C_3 - C_{10} циклоалкил.

[00204] Иллюстративный вариант осуществления № 3. Композиция согласно пункту 2, где X представляет собой $-CH_2YCH_2-$.

[00205] Иллюстративный вариант осуществления № 4. Композиция согласно пункту 3, где Y представляет собой O, S или CH_2 .

[00206] Иллюстративный вариант осуществления № 5. Композиция согласно пункту 1, где X представляет собой $-(CH_2)_3-$.

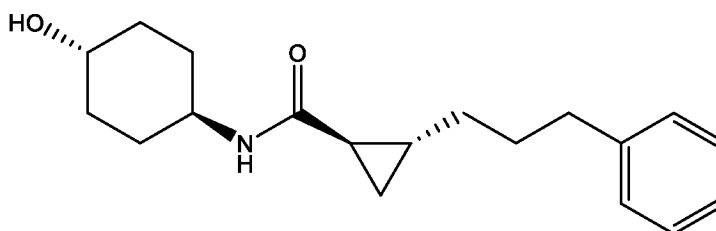
[00207] Иллюстративный вариант осуществления № 6. Композиция согласно пункту 5, где активатор митофузина имеет структуру, представленную с помощью



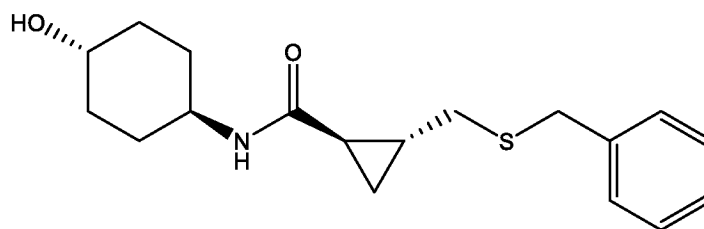
(1R,2R)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)-2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксамид

[00208] Иллюстративный вариант осуществления № 7. Композиция согласно пункту 6, где активатор митофузина является по меньшей мере частично кристаллическим.

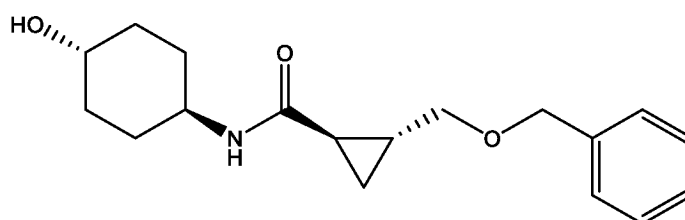
[00209] Иллюстративный вариант осуществления № 8. Композиция согласно пункту 1, где активатор митофузина имеет структуру, представленную с помощью одной или более формул, выбранных из группы, состоящей из



(1R,2R)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)-2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксамид,



(1R,2R)-2-((бензилтио)метил)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)циклопропан-1-карбоксамида и

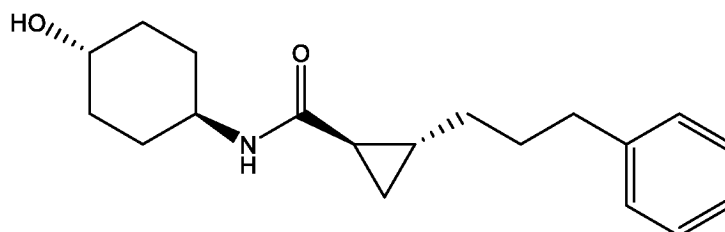


(1R,2R)-2-((бензилокси)метил)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)циклопропан-1-карбоксамида.

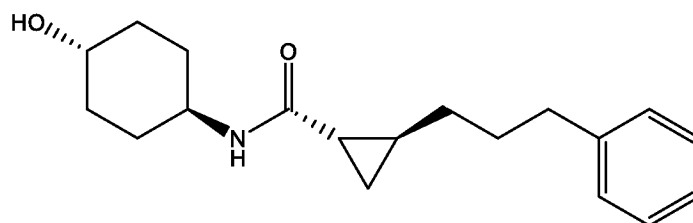
[00210] Иллюстративный вариант осуществления № 9. Композиция согласно пункту 8, где активатор митофузина является по меньшей мере частично кристаллическим.

[00211] Иллюстративный вариант осуществления № 10. Композиция согласно пункту 1, дополнительно содержащая фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

[00212] Иллюстративный вариант осуществления № 11. По меньшей мере частично кристаллическое соединение, имеющее структуру, представленную с помощью

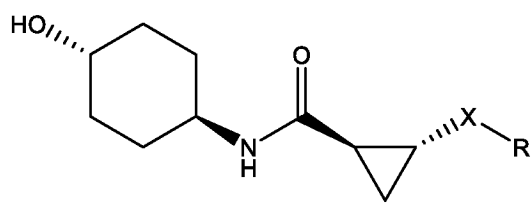


(1R,2R)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)-2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксамид или



(1S,2S)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)-2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксамид.

[00213] **Иллюстративный вариант осуществления № 12.** Способ, включающий введение терапевтически эффективного количества композиции, содержащей активатор митофузина или его фармацевтически приемлемую соль, субъекту, у которого имеется ассоциированное с митохондриями заболевание, нарушение или состояние или подозрение на его наличие, при этом активатор митофузина имеет структуру, представленную с помощью



где X представляет собой 3-атомную спейсерную группу, и R представляет собой фенил или замещенный фенил.

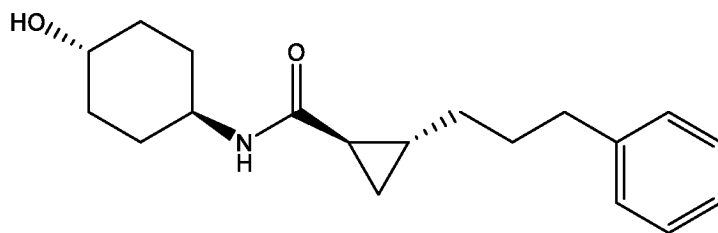
[00214] **Иллюстративный вариант осуществления № 13.** Способ согласно пункту 12, где X представляет собой $-\text{CH}_2\text{YCH}_2-$ или $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{Y}-$; где Y представляет собой O, S, SO, SO₂, CR¹R² или NR³; где R¹ и R² независимо выбраны из группы, состоящей из H, F, C₁-C₁₀алкила и C₃-C₁₀циклоалкила, или R¹ и R², взятые вместе, образуют циклоалкил или гетероциклоалкил, и R³ представляет собой H, C₁-C₁₀алкил или C₃-C₁₀циклоалкил.

[00215] **Иллюстративный вариант осуществления № 14.** Способ согласно пункту 13, где X представляет собой $-\text{CH}_2\text{YCH}_2-$.

[00216] **Иллюстративный вариант осуществления № 15.** Способ согласно пункту 14, где Y представляет собой O, S или CH₂.

[00217] **Иллюстративный вариант осуществления № 16.** Способ согласно пункту 12, где X представляет собой $-(\text{CH}_2)_3-$.

[00218] **Иллюстративный вариант осуществления № 17.** Способ согласно пункту 16, где активатор митофузина имеет структуру, представленную с помощью



[00219] (1R,2R)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)-2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксамид.

[00220] **Иллюстративный вариант осуществления № 18.** Способ согласно пункту 17, где активатор митофузина является по меньшей мере частично кристаллическим.

[00221] **Иллюстративный вариант осуществления № 19.** Способ согласно пункту 12, где ассоциированное с митохондриями заболевание, нарушение или состояние представляет собой генетическое или негенетическое нарушение, физическое повреждение и/или химическое поражение периферической нервной системы (PNS) или центральной нервной системы (CNS).

[00222] **Иллюстративный вариант осуществления № 20.** Способ согласно пункту 19, где нарушение со стороны PNS или CNS представляет собой одно или более состояний, выбранных из группы, состоящей из хронического нейродегенеративного состояния, при котором слияние, приспособленность и/или транспорт митохондрий является/являются нарушенными; заболевания или нарушения, ассоциированного с дисфункцией митофузина 1 (MFN1) или митофузина 2 (MFN2); заболевания, ассоциированного с фрагментацией, дисфункцией и/или нарушением подвижности митохондрий; дегенеративного нейромышечного состояния; болезни Шарко-Мари-Тута; бокового амиотрофического склероза; болезни Хантингтона; болезни Альцгеймера; болезни Паркинсона; наследственной моторно-сенсорной нейропатии; аутизма; аутосомно-доминантной атрофии зрительного нерва (ADOA); мышечной дистрофии; болезни Лу Герига; рака; митохондриальной миопатии; сахарного диабета и глухоты (DAD); наследственной оптической нейропатии Лебера (LHON); синдрома Лея;

подострой склерозирующей энцефалопатии; нейропатии, атаксии, пигментного ретинита и птоза (NARP); мионейрогенной желудочно-кишечной энцефалопатии (MNGIE); миоклонической эпилепсии с рваными мышечными волокнами (MERRF); митохондриальной миопатии, энцефаломиопатии, лактатацидоза и инсультоподобных симптомов (MELAS); истощения мтДНК; митохондриальной нейрогастроинтестинальной энцефаломиопатии (MNGIE); дизавтономной митохондриальной миопатии; митохондриальной каналопатии; дефицита пируватдегидрогеназного комплекса (PDCD/PDH); диабетической нейропатии; периферической нейропатии, индуцированной химиотерапией; повреждения с размождением тканей; повреждения спинного мозга (SCI); травматического повреждения головного мозга; инсульта; повреждения зрительного нерва; состояний, которые предусматривают разъединение аксонов; и любой их комбинации.

Определения

[00223] Если не указано иное, то предполагается, что следующие термины и фразы, используемые в данном документе, имеют следующие значения.

[00224] Термины «лечить» или «лечение», если в контексте не указано иное, относятся к любому введению терапевтической молекулы (например, любого соединения, описанного в данном документе), которое обеспечивает частичное или полное облегчение, уменьшение интенсивности проявлений, ослабление, подавление, снижение тяжести и/или снижение частоты возникновения одного или более симптомов или признаков конкретного заболевания, нарушения и/или состояния (например, рака).

[00225] Используемый в данном документе термин «предупреждение», «предупреждать» или «защита от» описывает задержку начала проявления или замедление прогрессирования заболевания, состояния или нарушения.

[00226] Используемый в данном документе термин «субъект» включает человека и отличных от человека животных, а также линии клеток, культуры клеток, ткани и органы. В некоторых вариантах осуществления субъект является млекопитающим. Млекопитающее может являться, *например*, человеком или подходящим отличным от человека млекопитающим, таким как примат, мышь,

крыса, собака, кошка, корова, лошадь, коза, верблюд, овца или свинья. Субъект может также являться дикой птицей или домашней птицей. В некоторых вариантах осуществления субъект является человеком.

[00227] Используемый в данном документе термин «субъект, нуждающийся в этом» относится к субъекту, у которого имеется заболевание или у которого имеется увеличенный риск развития заболевания. Субъект, нуждающийся в этом, может являться субъектом, у которого ранее было диагностировано или идентифицировано наличие заболевания или нарушения, раскрытого в данном документе. Субъект, нуждающийся в этом, может также являться субъектом, который страдает заболеванием или нарушением, раскрытым в данном документе. В качестве альтернативы субъект, нуждающийся в этом, может являться субъектом, у которого имеется увеличенный риск развития такого заболевания или нарушения относительно популяции в целом (т. е. субъектом, который является предрасположенным к развитию такого нарушения относительно популяции в целом). Субъект, нуждающийся в этом, может характеризоваться рефрактерностью или резистентностью заболевания или нарушения, раскрытого в данном документе (т. е. заболевания или нарушения, раскрытого в данном документе, которое не отвечает или еще не ответило на лечение). Субъект может быть резистентным в начале лечения или может стать резистентным в ходе лечения. В некоторых вариантах осуществления субъект, нуждающийся в этом, получал все известные эффективные виды терапии для заболевания или нарушения, раскрытого в данном документе, и они оказались безуспешными для него. В некоторых вариантах осуществления субъект, нуждающийся в этом, получал по меньшей мере один вид предшествующей терапии.

[00228] Термин «терапевтически эффективное количество» или «эффективное количество» относится к количеству конъюгата, эффективному для лечения или предупреждения заболевания или нарушения у субъекта (например, описанного в данном документе).

[00229] Используемый в данном документе термин «фармацевтическая композиция» относится к композиции, в которой действующее вещество составлено вместе с одним или более фармацевтически приемлемыми носителями. В некоторых вариантах осуществления действующее вещество присутствует в

количестве однократной дозы, подходящем для введения в терапевтической схеме, которая демонстрирует статистически значимую вероятность достижения предварительно определенного терапевтического эффекта при введении для соответствующей популяции. В некоторых вариантах осуществления фармацевтическая композиция может быть специально составлена для введения в твердой или жидкой форме, включая формы, адаптированные для следующего: перорального введения, например, жидкие лекарственные формы для перорального введения (водные или неводные растворы или суспензии), таблетки, например, предназначенные для трансбуккальной, подъязычной и системной абсорбции, болюсы, порошки, гранулы, пасты для нанесения на язык; парентерального введения, например, путем подкожной, внутримышечной, внутривенной или эпидуральной инъекции, как, например, в виде стерильного раствора или суспензии или состава с замедленным высвобождением; местного нанесения, например, в виде крема, мази или пластыря или спрея с контролируемым высвобождением, применяемых в отношении кожи, легких или полости рта; интравагинально или интаректально, например, в виде pessaria, крема или пены; сублингвально; окулярно; трансдермально или назально, легочным путем и через другие поверхности слизистых оболочек.

[00230] Используемый в данном документе термин «введение», как правило, относится к введению композиции субъекту или в систему для достижения доставки средства, которое представляет собой или включено в композицию. Специалистам средней квалификации в данной области будет известно множество путей, которые могут в подходящих обстоятельствах использоваться для введения субъекту, например, человеку. Примеры путей введения включают парентеральное, например, внутривенное, внутрикожное, подкожное, пероральное (например, ингаляционное), трансдермальное (т. е. местное), чресслизистое и ректальное введение. Например, в некоторых вариантах осуществления введение может являться окулярным, пероральным, парентеральным, местным и т. д. В некоторых вариантах осуществления введение является парентеральным (например, внутривенным введением). В некоторых вариантах осуществления внутривенное введение представляет собой внутривенную инфузию. В некоторых конкретных вариантах осуществления

введение может являться бронхиальным (например, путем бронхиальной инстилляции), трансбуккальным, дермальным (которое может представлять собой или включать, например, одно или более из местного введения в дерму, внутрикожного, интердермального, трансдермального и т. д.), энтеральным, внутриартериальным, внутрикожным, внутрижелудочным, интрамедуллярным, внутримышечным, интраназальным, внутрибрюшинным, интратекальным, внутривенным, внутрижелудочковым, в пределах определенного органа (например, внутрипеченочным), чресслизистым, назальным, пероральным, ректальным, подкожным, подъязычным, местным, трахеальным (например, путем интратрахеальной инстилляции), вагинальным, витреальным и т. д.

[00231] Если не указано иное, термин «алкил» как таковой или в качестве части другого термина относится к замещенному, или прямоцепочечному, или разветвленному насыщенному или ненасыщенному углеводороду, содержащему указанное число атомов углерода (например, «C₁-C₈алкил» или «C₁-C₁₀алкил» относится к алкильной группе, содержащей от 1 до 8 или от 1 до 10 атомов углерода соответственно). Если число атомов углерода не указано, то алкильная группа содержит от 1 до 8 атомов углерода. Иллюстративные прямоцепочечные группы «—C₈алкил» включают без ограничения -метил, -этил, -н-пропил, -н-бутил, -н-пентил, -н-гексил, -н-гептил и -н-октил; при этом разветвленные C₃-C₈алкилы включают без ограничения -изопропил, -втор-бутил, -изобутил, -трет-бутил, -изопентил и -2-метилбутил; ненасыщенные C₂-C₈алкилы включают без ограничения -винил, -аллил, -1-бутенил, -2-бутенил, -изобутиленил, -1-пентенил, -2-пентенил, -3-метил-1-бутенил, -2-метил-2-бутенил, -2,3-диметил-2-бутенил, -1-гексил, 2-гексил, -3-гексил, -ацетиленил, -пропинил, -1-бутинил, -2-бутинил, -1-пентинил, -2-пентинил и -3-метил-1-бутинил. Иногда алкильная группа является незамещенной. Алкильная группа может быть замещенной одной или более группами. В других аспектах алкильная группа будет насыщенной.

[00232] Используемый в данном документе термин «необязательно замещенный алкил» относится к незамещенному алкилу или алкилу, содержащему обозначенные заместители, заменяющие один или более атомов водорода при одном или более атомах углерода углеводородного остова. Такие заместители могут включать, например, алкил, алкенил, алкинил, галоген, гидроксил,

алкилкарбонилокси, арилкарбонилокси, алкоксикарбонилокси, арилоксикарбонилокси, карбоксилат, алкилкарбонил, арилкарбонил, алкоксикарбонил, аминокарбонил, алкиламинокарбонил, диалкиламинокарбонил, алкилтиокарбонил, алкоксил, фосфато, фосфонато, фосфинато, amino (в том числе алкиламино, диалкиламино, ариламино, диариламино и алкилариламино), ациламино (в том числе алкилкарбониламино, арилкарбониламино, карбамоил и уреидо), амидино, имино, сульфгидрил, алкилтио, арилтио, тиокарбоксилат, сульфаты, алкилсульфинил, сульфонато, сульфоамил, сульфонамидо, нитро, трифторметил, циано, азидо, гетероцикллил, алкиларил или ароматический или гетероароматический компонент.

[00233] Если не указано иное, «алкилен» как таковой или в качестве части другого термина относится к замещенному или насыщенному, разветвленному, или прямоцепочечному, или циклическому углеводородному радикалу с указанным количеством атомов углерода, как правило, 1—10 атомами углерода, и содержащему два одновалентных радикальных центра, полученных путем удаления двух атомов водорода при одном и том же или двух разных атомах углерода исходного алкана. Типичные алкиленовые радикалы включают без ограничения метилен ($-\text{CH}_2-$), 1,2-этилен ($-\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,3-пропилен ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$), 1,4-бутилен ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2-$) и т. п. В предпочтительных аспектах алкилен представляет собой разветвленный или прямоцепочечный углеводород (т. е. он не представляет собой циклический углеводород).

[00234] Если не указано иное, «арил» как таковой или в качестве части другого термина означает замещенный или одновалентный карбоциклический ароматический углеводородный радикал с указанным числом атомов углерода, как правило, 6-20 атомами углерода, полученный путем удаления одного атома водорода от одного атома углерода исходной ароматической кольцевой системы. Некоторые арильные группы представлены в иллюстративных структурах как «Ar». Типичные арильные группы включают без ограничения радикалы, полученные из бензола, замещенного бензола, нафталина, антрацена, бифенила и т. п. Иллюстративная арильная группа представляет собой фенильную группу.

[00235] Используемый в данном документе термин «гетероциклоалкил» относится к насыщенной или частично ненасыщенной 3-8-членной

моноциклической или 6-10-членной бициклической (конденсированной, мостиковой или спиро) кольцевой системе, содержащей один или более гетероатомов, независимо выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода и серы, если не указано иное. Примеры гетероциклоалкильных групп включают без ограничения пиперидинил, пиперазинил, пирролидинил, диоксанил, тетрагидрофуранил, изоиндолинил, индолинил, имидазолидинил, пиразолидинил, оксазолидинил, изоксазолидинил, триазолидинил, оксиранил, азетидинил, оксетанил, тиетанил, 1,2,3,6-тетрагидропиридинил, тетрагидропиранил, дигидропиранил, пиранил, морфолинил, тетрагидротииопиранил, 1,4-дiazепанил, 1,4-оксазепанил, 2-окса-5-азабицикло[2.2.1]гептанил, 2,5-дизабицикло[2.2.1]гептанил, 2-окса-6-азаспиро[3.3]гептанил, 2,6-дiazаспиро[3.3]гептанил, 1,4-диокса-8-азаспиро[4.5]деканил, 1,4-диоксаспиро[4.5]деканил, 1-оксаспиро[4.5]деканил, 1-азаспиро[4.5]деканил, 3'Н-спиро[циклогексан-1,1'-изобензофуран]-ил, 7'Н-спиро[циклогексан-1,5'-фуоро[3,4-b]пиридин]-ил, 3'Н-спиро[циклогексан-1,1'-фуоро[3,4-c]пиридин]-ил, 3-азабицикло[3.1.0]гексанил, 3-азабицикло[3.1.0]гексан-3-ил, 1,4,5,6-тетрагидропирроло[3,4-c]пиразолил, 3,4,5,6,7,8-гексагидропиридо[4,3-d]пиримидинил, 4,5,6,7-тетрагидро-1Н-пиразоло[3,4-c]пиридинил, 5,6,7,8-тетрагидропиридо[4,3-d]пиримидинил, 2-азаспиро[3.3]гептанил, 2-метил-2-азаспиро[3.3]гептанил, 2-азаспиро[3.5]нонанил, 2-метил-2-азаспиро[3.5]нонанил, 2-азаспиро[4.5]деканил, 2-метил-2-азаспиро[4.5]деканил, 2-оксаазаспиро[3.4]октанил, 2-оксаазаспиро[3.4]октан-6-ил и т. п. В случае с полициклическим гетероциклоалкилом только одно из колец гетероциклоалкила должно быть неароматическим.

[00236] Используемый в данном документе термин «гетероарил» предполагается как включающий стабильное 5-, 6- или 7-членное моноциклическое или 7-, 8-, 9- или 10-членное бициклическое ароматическое гетероциклическое кольцо, которое состоит из атомов углерода и одного или более гетероатомов, независимо выбранных из группы, состоящей из азота, кислорода и серы. Атом азота может быть замещенным или незамещенным (*m. e.* N или NR, где R представляет собой H или другие заместители, как это определено). Гетероатомы, представляющие собой атомы азота и серы, необязательно могут быть

окисленными (*m. e.* $N \rightarrow O$ и $S(O)_p$, где $p = 1$ или 2). Следует отметить, что общее число атомов S и O в ароматическом гетероцикле составляет не более 1. Примеры гетероарильных групп включают пиррол, фуран, тиофен, тиазол, изотиазол, имидазол, триазол, тетразол, пиразол, оксазол, изоксазол, пиридин, пиразин, пиридазин, пиримидин и т. п.

[00237] Если не указано иное, термин «гетероалкил» как таковой или в комбинации с другим термином означает, если не указано иное, стабильный углеводород с прямой или разветвленной цепью или их комбинацией, полностью насыщенный или характеризующийся степенями ненасыщенности в количестве от 1 до 3, состоящий из указанного числа атомов углерода и от одного до десяти, предпочтительно от одного до трех, гетероатомов, выбранных из группы, состоящей из O, N, Si и S, и где атомы азота и серы могут необязательно быть окисленными, и гетероатом, представляющий собой атом азота, может необязательно быть кватернизированным. Гетероатом(гетероатомы) O, N и S может(могут) быть помещен(помещены) в любое внутреннее положение гетероалкильной группы или в положение, в котором алкильная группа присоединена к остальной части молекулы. Гетероатом Si может быть помещен в любое положение гетероалкильной группы, в том числе положение, в котором алкильная группа присоединена к остальной части молекулы. Примеры включают $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})-\text{CH}_3$, $-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{C}(\text{O})-\text{CH}_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}(\text{O})_2-\text{CH}_3$, $-\text{CH}=\text{CH}-\text{O}-\text{CH}_3$, $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$, $-\text{CH}_2-\text{CH}=\text{N}-\text{O}-\text{CH}_3$ и $-\text{CH}=\text{CH}-\text{N}(\text{CH}_3)-\text{CH}_3$. Последовательно расположенными могут быть до двух гетероатомов, как, например, в $-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{OCH}_3$ и $-\text{CH}_2-\text{O}-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$. Как правило, C_1 - C_4 гетероалкил или гетероалкилен содержит от 1 до 4 атомов углерода и 1 или 2 гетероатома, и C_1 - C_3 гетероалкил или гетероалкилен содержит от 1 до 3 атомов углерода и 1 или 2 гетероатома. В некоторых аспектах гетероалкил или гетероалкилен является насыщенным.

[00238] Если не указано иное, термин «гетероалкилен» как таковой или в комбинации с другим термином означает двухвалентную группу, полученную из гетероалкила (обсуждаемого выше), которая поясняется на примере в виде $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$ и $-\text{CH}_2-\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CH}_2-$. В случае с

гетероалкиленовыми группами гетероатомы могут также занимать один или оба конца цепи. Еще дополнительно, в случае с алкиленовыми и гетероалкиленовыми линкерными группами не подразумевается ориентация линкерной группы.

[00239] Как используется в данном документе, «защитная группа» означает компонент, который предотвращает или снижает способность атома или функциональной группы, с которым он связан, участвовать в нежелательных реакциях. Типичные защитные группы для атомов или функциональных групп приведены в Greene (1999), «PROTECTIVE GROUPS IN ORGANIC SYNTHESIS, 3RD ED.», Wiley Interscience. Защитные группы для гетероатомов, таких как кислород, сера и азот, используют в некоторых случаях, чтобы минимизировать их нежелательные реакции с электрофильными соединениями или избежать их. В других случаях защитную группу используют для снижения или устранения нуклеофильности и/или основности незащищенного гетероатома. Неограничивающие примеры защищенного атома кислорода приведены в виде —OR^{PR}, где R^{PR} представляет собой защитную группу для гидроксила, где гидроксил обычно защищен в виде сложного эфира (например, ацетата, пропионата или бензоата). Другие защитные группы для гидроксила не препятствуют нуклеофильности металлоорганических реагентов или других высокоосновных реагентов, где гидроксил обычно защищен в виде эфира, в том числе алкиловых или гетероциклоалкиловых эфиров (например, метилового или тетрагидропиранилового эфиров), алкоксиметилловых эфиров (например, метоксиметилового или этоксиметилового эфиров), необязательно замещенных ариловых эфиров и силиловых эфиров (например, триметилсилила (TMS), триэтилсилила (TES), трет-бутилдифенилсилила (TBDPS), трет-бутилдиметилсилила (TBS/TBDMS), триизопропилсилила (TIPS) и [2-(триметилсилил)этокси]метилсилила (SEM)). Защитные группы для атома азота включают группы для первичных или вторичных аминов, как в —NHR^{PR} или —N(R^{PR})₂—, где по меньшей мере одна из R^{PR} представляет собой защитную группу для атома азота, или обе R^{PR} вместе образуют защитную группу.

[00240] Защитная группа является подходящей, если она способна обеспечить предотвращение или избегание нежелательных побочных реакций или преждевременную утрату защитной группы в условиях реакции, требуемых для

осуществления желаемого химического преобразования где-либо еще в молекуле, и в ходе очистки вновь образованной молекулы в случае необходимости, и может быть удалена в условиях, которые не оказывают неблагоприятного воздействия на структурную или стереохимическую целостность данной вновь образованной молекулы. В качестве примера, а не ограничения, подходящая защитная группа может включать в себя ранее описанные группы для защиты функциональных групп. Подходящая защитная группа иногда представляет собой защитную группу, используемую в реакциях сочетания пептидов.

[00241] Как используется в данном документе, «арилалкил» или «гетероарилалкил» означает заместитель, компонент или группу, где арильный компонент связан с алкильным компонентом, т. е. арилалкил-, где алкильная и арильная группы описаны выше, например, $C_6H_5-CH_2-$ или $C_6H_5-CH(CH_3)CH_2-$. Арилалкил или гетероарилалкил ассоциирован с более крупной структурой или компонентом через sp^3 -атом углерода его алкильного компонента. «Метаболит» представляет собой продукт, образованный в результате метаболизма в организме указанного соединения, его производного, или его конъюгата, или его соли. Метаболиты соединения, его производного или его конъюгата могут быть идентифицированы с применением обычных методик, известных из уровня техники, и их формы активности могут быть определены с применением тестов, таких как описанные в данном документе. Такие продукты могут образовываться, например, в результате окисления, гидроксирования, восстановления, гидролиза, амидирования, дезамидирования, этерификации, деэтерификации, ферментативного расщепления и т. п. вводимого соединения. Соответственно, настоящее изобретение включает метаболиты соединений, их производного или их конъюгата по настоящему изобретению, в том числе соединений, их производного или их конъюгата, полученные посредством способа, включающего приведение соединения, его производного или его конъюгата по настоящему изобретению в контакт с организмом млекопитающего в течение периода времени, достаточного для получения продукта его метаболизма.

[00242] Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемая соль» относится к органическим или неорганическим солям соединения по настоящему изобретению, которые характеризуются

установленными свойствами токсичности и/или биораспределения. Подходящие соли включают без ограничения сульфатные, цитратные, ацетатные, оксалатные, хлоридные, бромидные, йодидные, нитратные, бисульфатные, фосфатные, кислые фосфатные, изоникотинатные, лактатные, салицилатные, кислые цитратные, тартратные, олеатные, таннатные, пантотенатные, битартратные, аскорбатные, сукцинатные, малеатные, гентизинатные, фумаратные, глюконатные, глюкуронатные, сахаратные, формиатные, бензоатные, глутаматные, метансульфонатные, этансульфонатные, бензолсульфонатные, п-толуолсульфонатные и/или памоатные (*т. е.* 1,1'-метилен-бис-(2-гидрокси-3-нафтоатные)) соли. Фармацевтически приемлемая соль может уравнивать заряд исходного соединения, присутствуя в качестве противоиона. Может присутствовать более одного противоиона. Если присутствует несколько противоионов, то соединения могут быть представлены в виде смешанной фармацевтически приемлемой соли.

[00243] Фармацевтически приемлемые соли и/или гидраты активаторов митофузина могут также быть представлены в композициях по настоящему изобретению. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый сольват» относится к ассоциации между одной или более молекулами растворителя и активатором митофузина по настоящему изобретению или его солью, где сольват характеризуется установленными свойствами токсичности и/или биораспределения. Примеры растворителей, которые могут образовывать фармацевтически приемлемые сольваты, включают без ограничения воду, изопропанол, этанол, метанол, DMSO, этилацетат, уксусную кислоту и/или этаноламин. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемый гидрат» относится к активатору митофузина по настоящему изобретению или его соли, которые дополнительно содержат стехиометрическое или нестехиометрическое количество воды, связанной силами нековалентного межмолекулярного взаимодействия, где гидрат характеризуется установленными свойствами токсичности и/или биораспределения.

[00244] Активаторы митофузина, описанные в данном документе, могут быть составлены с применением одного или более фармацевтически приемлемых вспомогательных веществ (носителей), известных специалистам средней

квалификации в данной области. Используемый в данном документе термин «фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество» относится к веществам или компонентам, которые не обуславливают неприемлемые утраты фармакологической активности или неприемлемые неблагоприятные побочные эффекты при введении субъекту. Иллюстративные «фармацевтически приемлемые вспомогательные вещества» включают без ограничения растворители, дисперсионные среды, покрытия, антибактериальные средства, противогрибковые средства, изотонические средства и средства, задерживающие абсорбцию, при условии, что любое из таких средств не вызывает значительные побочные эффекты или не является несовместимым с активатором митофузина в композиции. Иллюстративные вспомогательные вещества описаны, например, в Remington's Pharmaceutical Sciences (A.R. Gennaro, Ed.), 21st edition, ISBN: 0781746736 (2005), а также Фармакопее Соединенных Штатов Америки (USP 29) и Национальном формуляре (NF 24), United States Pharmacopeial Convention, Inc, Rockville, Maryland, 2005 («USP/NF»), или более позднем издании, и в компонентах, перечисленных в постоянно обновляемой доступной в режиме онлайн базе данных FDA по поиску неактивных ингредиентов. Другие применимые компоненты, которые не описаны в USP/NF, могут также применяться. Такие составы могут содержать терапевтически эффективное количество одного или более активаторов митофузина, необязательно в виде соли, гидрата и/или сольвата, вместе с подходящим количеством вспомогательного вещества для получения формы для надлежащего введения субъекту.

[00245] Композиции по настоящему изобретению могут быть стабильными в установленных условиях хранения. «Стабильная» композиция относится к композиции, характеризующейся достаточной стабильностью для обеспечения возможности хранения при удобной температуре, такой как от приблизительно 0°C до приблизительно 60°C или от приблизительно -20°C до приблизительно 50°C, в течение коммерчески оправданного периода времени, такого как по меньшей мере приблизительно один день, по меньшей мере приблизительно одна неделя, по меньшей мере приблизительно один месяц, по меньшей мере приблизительно три месяца, по меньшей мере приблизительно

шесть месяцев, по меньшей мере приблизительно один год или по меньшей мере приблизительно два года.

[00246] Композиции по настоящему изобретению могут быть адаптированы, чтобы подходить для желаемого способа введения, который может включать без ограничения парентеральный, легочный, пероральный, местный, трансдермальный, внутрикожный, внутримышечный, внутрибрюшинный, внутривенный, подкожный, интраназальный, эпидуральный, офтальмологический, легочный, эпидуральный, трансбуккальный и ректальный. Композиции также можно вводить в комбинации с одним или более дополнительными средствами или вместе с другими биологически активными или биологически инертными средствами.

[00247] Композиции с контролируемым высвобождением (или с замедленным высвобождением) могут быть составлены для продления активности активаторов митофузина и снижения частоты введения доз. Композиции с контролируемым высвобождением могут также применяться для влияния на время начала действия или другие характеристики, такие как уровни активатора митофузина в плазме крови, и следовательно, влияния на частоту возникновения побочных эффектов. Композиции с контролируемым высвобождением могут быть разработаны для первоначального высвобождения количества одного или более активаторов митофузина, которое обеспечивает желаемый терапевтический эффект, и постепенного и непрерывного высвобождения других количеств активатора митофузина для поддержания уровня терапевтического эффекта на протяжении длительного периода. Для поддержания практически постоянного уровня активатора митофузина в организме активатор митофузина может высвобождаться со скоростью, достаточной для замены количества, метаболизирующегося или выводимого из организма субъекта. Контролируемое высвобождение может стимулироваться различными индукторами (*например*, изменением pH, изменением температуры, ферментами, водой или другими физиологическими условиями или молекулами).

[00248] Средства или композиции, описанные в данном документе, могут также применяться в комбинации с другими терапевтическими воздействиями, как далее описано ниже. Таким образом, в дополнение к видам

терапии, описанным в данном документе, также можно предоставить субъекту другие виды терапии, которые, как известно, являются эффективными для лечения заболевания, нарушения или состояния, на которое нацелен активатор митофузина, или связанного заболевания, нарушения или состояния.

[00249] Активаторы митофузина по настоящему изобретению могут стимулировать слияние митохондрий, увеличивать приспособленность митохондрий и усиливать субклеточный транспорт митохондрий. Соответственно, в другом аспекте настоящего изобретения любой активатор митофузина или комбинацию активаторов митофузина по настоящему изобретению или их фармацевтически приемлемую соль можно вводить в терапевтически эффективном количестве субъекту, у которого имеется ассоциированное с митохондриями заболевание, нарушение или состояние или подозрение на его наличие. Субъект может являться человеком или другим млекопитающим, у которого имеется ассоциированное с митохондриями заболевание, нарушение или состояние или подозрение на его наличие.

[00250] Ассоциированное с митохондриями заболевание, нарушение или состояние может представлять собой генетическое или негенетическое нарушение, физическое повреждение и/или химическое поражение периферической нервной системы (PNS) или центральной нервной системы (CNS). В некоторых аспектах в способе лечения заболевания, нарушения или состояния, при котором показан активатор митофузина, нарушение со стороны PNS или CNS может быть выбрано из любого одного или комбинации из хронического нейродегенеративного состояния, при котором слияние, приспособленность или транспорт митохондрий являются нарушенными; заболевания или нарушения, ассоциированного с дисфункцией митофузина 1 (MFN1) или митофузина 2 (MFN2); заболевания, ассоциированного с фрагментацией, дисфункцией или нарушением подвижности митохондрий; дегенеративного нейромышечного состояния, такого как болезнь Шарко-Мари-Тута, боковой амиотрофической склероз (ALS), болезнь Хантингтона, болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона, наследственная моторно-сенсорная нейропатия, аутизм, аутосомно-доминантная атрофия зрительного нерва (ADOA), мышечная дистрофия, болезнь Лу Герига, рак, митохондриальная миопатия, сахарный диабет и глухота (DAD), наследственная

оптическая нейропатия Лебера (LHON), синдром Лея, подострая склерозирующая энцефалопатия, нейропатия, атаксия, пигментный ретинит и птоз (NARP), мионейрогенная желудочно-кишечная энцефалопатия (MNGIE), миоклоническая эпилепсия с рваными мышечными волокнами (MERRF), митохондриальная миопатия, энцефаломиопатия, лактатацидоз, инсультоподобные симптомы (MELAS), истощение мтДНК, митохондриальная нейрогастроинтестинальная энцефаломиопатия (MNGIE), дизавтономная митохондриальная миопатия, митохондриальная каналопатия или дефицит пируватдегидрогеназного комплекса (PDCD/PDH), диабетическая нейропатия, периферическая нейропатия, индуцированная химиотерапией, повреждение с размождением тканей, SCI, травматическое повреждение головного мозга (TBI), инсульт, повреждение зрительного нерва и/или связанные состояния, которые предусматривают разъединение аксонов.

[00251] Другие ассоциированные с митохондриями заболевания, нарушения или состояния, которые можно лечить с помощью композиций, раскрытых в данном документе, представляют собой без ограничения болезнь Альцгеймера, ALS, болезнь Александра, болезнь Альперса, синдром Альперса-Гуттенлохера, дефицит альфа-метилацил-СоА-рацемазы, синдром Андерманна, синдром Арта, атаксию нейропатического спектра, атаксию (*например*, с глагодвигательной апраксией, аутосомно-доминантной мозжечковой атаксией, глухотой и нарколепсией), аутосомно-рецессивную спастическую атаксию Шарлевуа–Сагенэ, болезнь Баттена, нейродегенерацию, ассоциированную с бета-пропеллерными белками, цереброокулофациоскелетный синдром (COFS), кортикобазальную дегенерацию, заболевание CLN1, заболевание CLN10, заболевание CLN2, заболевание CLN3, заболевание CLN4, заболевание CLN6, заболевание CLN7, заболевание CLN8, когнитивную дисфункцию, врожденную нечувствительность к боли с ангидрозом, деменцию, семейную энцефалопатию с тельцами включения нейросерпина, семейную британскую деменцию, семейную датскую деменцию, нейродегенерацию, ассоциированную с гидроксилазой жирных кислот, атаксию Фридрейха, болезнь Герстманна-Штраусслера-Шейнкера, GM2-ганглиозидоз (*например*, вариант AB), HMSN 7 типа (*например*, с пигментным ретинитом), болезнь Хантингтона, младенческую нейроаксональную дистрофию,

наследственный восходящий спастический паралич с началом в младенческом возрасте, спиноцереbellарную атаксию с началом в младенческом возрасте, ювенильный первичный боковой склероз, болезнь Кеннеди, куру, болезнь Лея, синдром Маринеску-Шегрена, умеренное когнитивное нарушение (MCI), нейродегенерацию, ассоциированную с мембранными белками митохондрий, болезнь двигательных нейронов, мономелическую амиотрофию, болезни двигательных нейронов (MND), множественную системную атрофию, множественную системную атрофию с ортостатической гипотензией (синдром Шая-Дрейджера), рассеянный склероз, множественную системную атрофию, нейродегенерацию при синдроме Дауна (NDS), возрастную нейродегенерацию, нейродегенерацию с накоплением железа в головном мозге, нейромиелит зрительного нерва, нейродегенерацию, ассоциированную с пантотенаткиназой, опсоклонус-миоклонус, прионную болезнь, прогрессирующую многоочаговую лейкоэнцефалопатию, болезнь Паркинсона, нарушения, связанные с болезнью Паркинсона, поликистозную липомембранозную остеодисплазию со склерозирующей лейкоэнцефалопатией, прионную болезнь, прогрессирующую внешнюю офтальмоплегию, нейропатию с дефицитом переносчика рибофлавина, болезнь Сандхоффа, спинальную мышечную атрофию (SMA), спиноцереbellарную атаксию (SCA), стриатонигральную дегенерацию, формы трансмиссивной губчатой энцефалопатии (прионные болезни) и/или дегенерацию, подобную валлеровой.

[00252] Еще некоторые другие ассоциированные с митохондриями заболевания, нарушения или состояния, которые можно лечить с помощью композиций, раскрытых в данном документе, включают абулию; аграфию; алкоголизм; алексию; синдром чужой руки; синдром Аллана-Херндона-Дадли; альтернирующую гемиплегию детского возраста; болезнь Альцгеймера; преходящую слепоту; амнезию; ALS; аневризму; синдром Ангельмана; анозогнозию; афазию; апраксию; арахноидит; мальформацию Арнольда-Киари; асоматогнозию; синдром Аспергера; атаксию; синдром дефицита внимания и гиперактивности; синдром ATR-16; нарушение обработки слуховой информации; расстройство аутистического спектра; болезнь Бехчета; биполярное расстройство; паралич Белла; повреждение плечевого сплетения; повреждение головного мозга;

поражение головного мозга; опухоль головного мозга; миопатию Броди; болезнь Канавана; синдром Капгра; карпальный туннельный синдром; каузалгию; центральный болевой синдром; центральный понтинный миелинолиз; центронуклеарную миопатию; краниальное нарушение; аневризму сосудов головного мозга; церебральный артериосклероз; церебральную атрофию; церебральную аутосомно-доминантную артериопатию с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией (CADASIL); синдром церебральной дисгенезии, нейропатии, ихтиоза и кератодермии (синдром CEDNIK); церебральный гигантизм; церебральный паралич; церебральный васкулит; стеноз шейного отдела позвоночника; болезнь Шарко-Мари-Тута; мальформацию Киари; хорею; синдром хронической усталости; хроническую воспалительную демиелинизирующую полинейропатию (CIDP); хроническую боль; синдром Коккейна; синдром Коффина-Лоури; кому; комплексный регионарный болевой синдром; компрессионную нейропатию; врожденную лицевую диплегию; кортикобазальную дегенерацию; краниальный артериит; краниосиностоз; болезнь Крейтцфельда-Якоба; кумулятивные травматические расстройства; синдром Кушинга; циклотимическое расстройство; синдром циклической рвоты (CVS); инклюзионную цитомегалию (CIBD); цитомегаловирусную инфекцию; синдром Денди-Уокера; болезнь Доусона; синдром де Морсье; паралич Дежерин-Клюмпке; болезнь Дежерина-Сотта; синдром задержки фазы сна; деменцию; дерматомиозит; нарушение развития координации; диабетическую нейропатию; диффузный склероз; диплопию; расстройства сознания; синдром Дауна; синдром Драве; мышечную дистрофию Дюшенна; дизартрию; дизавтономию; дискалькулию; дисграфию; дискинезию; дислексию; дистонию; синдром «пустого турецкого седла»; энцефалит; энцефалоцеле; энцефалотригеминальный ангиоматоз; энкопрез; энурез; эпилепсию; эпилепсию с умственной отсталостью у женщин; паралич Эрба; эритромелалгию; эссенциальный тремор; синдром «взрывающейся головы»; болезнь Фабри; синдром Фара; потерю сознания; семейный спастический паралич; фебрильные судороги; синдром Фишера; атаксию Фридрейха; фибромиалгию; синдром Фовилля; фетальный алкогольный синдром; синдром ломкой X-хромосомы; синдром тремора/атаксии, ассоциированный с ломкой X-хромосомой (FXTAS); болезнь Гоше; генерализованную эпилепсию с фебрильными судорогами

плюс; синдром Герстманна; гигантоклеточный артериит; гигантоклеточную инклюзионную болезнь; глобоидно-клеточную лейкодистрофию; гетеротопию серого вещества; синдром Гийена-Барре; генерализованное тревожное расстройство; HTLV-1-ассоциированную миелопатию; синдром Галлервордена-Шпатца; травму головы; головную боль; гемифациальный спазм; наследственную спастическую параплегию; наследственную полиневропатическую атаксию; ганглионит узла коленца; опоясывающий герпес; синдром Хираямы; болезнь Гиршпрунга; синдром Эйди-Холмса; голопрозэнцефалию; болезнь Хантингтона; гидроанэнцефалию; гидроцефалию; гиперкортицизм; гипоксию; иммуноопосредованный энцефаломиелит; миозит с тельцами включения; недержание пигмента; младенческую форму болезни Рефсума; младенческие спазмы; воспалительную миопатию; внутрочерепную кисту; внутрочерепную гипертензию; изодигитрическую хромосому 15; синдром Жубера; синдром Карака; синдром Кернса-Сейра; синдром Кинсбурна; синдром Клейне-Левина; синдром Клиппеля-Фейля; болезнь Краббе; синдром Куфора-Ракеба; болезнь Лафоры; миастенический синдром Ламберта-Итона; синдром Ландау-Клеффнера; латеральный медуллярный синдром (синдром Валленберга); затруднения при обучении; болезнь Лея; синдром Леннокса-Гасто; синдром Леша-Нихана; лейкодистрофию; лейкоэнцефалопатию с исчезающим белым веществом; деменцию с тельцами Леви; лиссэнцефалию; синдром «запертого внутри»; болезнь Лу Герига (боковой амиотрофический склероз (ALS)); болезнь поясничного диска; стеноз поясничного отдела позвоночника; болезнь Лайма с неврологическими последствиями; болезнь Мачадо-Джозефа (спиноцеребеллярную атаксию 3 типа); макроэнцефалию; макропсию; синдром «высадки с корабля»; мегалэнцефалическую лейкоэнцефалопатию с подкорковыми кистами; мегалэнцефалию; синдром Мелькерссона-Розенталя; болезнь Меньера; менингит; болезнь Менкеса; метахроматическую лейкодистрофию; микроцефалию; микропсию; мигрень; синдром Миллера-Фишера; миниинсульт (транзиторную ишемическую атаку); мизофонию; митохондриальную миопатию; синдром Мебиуса; мономелическую амиотрофию; синдром Морвана; болезнь двигательных нейронов, см. ALS; нарушение двигательных навыков; болезнь мойя-мойя; формы мукополисахаридоза; мультиинфарктную деменцию; мультифокальную моторную

нейропатию; рассеянный склероз; множественную системную атрофию; мышечную дистрофию; миалгический энцефаломиелит; тяжелую миастению; диффузный миелинокластический склероз; младенческую миоклоническую энцефалопатию; миоклонус; миопатию; миотубулярную миопатию; врожденную миотонию; нарколепсию; неврологические проявления болезни Бехчета; нейрофиброматоз; злокачественный нейролептический синдром; неврологические проявления AIDS; неврологические последствия волчанки; нейромиотонию; нейрональный цероидный липофусциноз; нарушения миграции нейронов; нейропатию; невроз; болезнь Ниманна-Пика; расстройство не-24-часового цикла сна и бодрствования; расстройство невербального обучения; синдром О'Салливана-МакЛеода; затылочную невралгию; скрытую дизрафию спинного мозга; синдром Отахары; оливопонтocerebellарную атрофию; опсо-миоклональный синдром; неврит зрительного нерва; ортостатическую гипотензию; отосклероз; синдром профессиональной перегрузки; палинопсию; парестезию; болезнь Паркинсона; врожденную парамиотонию; паранеопластические заболевания; пароксизмальные приступы; синдром Парри-Ромберга; детские аутоиммунные нервно-психические расстройства, ассоциированные со стрептококковыми инфекциями (PANDAS); болезнь Пелицеуса-Мерцбахера; формы периодического паралича; периферическую нейропатию; первазивные расстройства развития; фантомную конечность/фантомную боль; световой чихательный рефлекс; болезнь накопления фитановой кислоты; болезнь Пика; защемление нерва; опухоли гипофиза; PMG; полинейропатию; полиомиелит; полимикрогирию; полимиозит; порэнцефалию; постполиомиелитный синдром; постгерпетическую невралгию (PHN); постуральную гипотензию; синдром Прадера-Вилли; первичный боковой склероз; прионные болезни; прогрессирующую гемифациальную атрофию; прогрессирующую многоочаговую лейкоэнцефалопатию; прогрессирующий надъядерный паралич; прозопагнозию; ложную опухоль головного мозга; квадрантную анопсию; тетраплегию; бешенство; радикулопатию; синдром Рамсея-Ханта 1 типа; синдром Рамсея-Ханта 2 типа; синдром Рамсея-Ханта 3 типа, см. синдром Рамсея-Ханта; энцефалит Расмуссена; рефлекторную нейроваскулярную дистрофию; болезнь Рефсума; расстройство поведения в REM-фазе сна; нарушение вследствие повторяющихся напряжений; синдром беспокойных ног; миелопатию,

ассоциированную с ретровирусной инфекцией; синдром Ретта; синдром Рея; нарушение ритмических движений; синдром Ромберга; пляску святого Вита; болезнь Сандхоффа; болезнь Шильдера (два различных состояния); шизэнцефалию; нарушение сенсорной интеграции; септооптическую дисплазию; синдром встрянутого ребенка; опоясывающий герпес; синдром Шая-Дрейджера; синдром Шегрена; апноэ во сне; сонную болезнь; снатиацию; синдром Сотоса; спастичность; расщепление позвоночника; повреждение спинного мозга; опухоли спинного мозга; спинальную мышечную атрофию; спинально-бульбарную мышечную атрофию; спиноцереbellлярную атаксию; рассечение мозолистого тела; синдром Стила-Ричардсона-Ольшевского; синдром мышечной скованности; инсульт; синдром Стерджа-Вебера; заикание; подострый склерозирующий панэнцефалит; субкортикальную артериосклеротическую энцефалопатию; поверхностный сидероз; хорею Сиденгама; обморок; синестезию; сирингомиелию; тарзальный туннельный синдром; позднюю дискинезию; позднюю дисфрению; кисту Тарлова; болезнь Тея-Сакса; височный артериит; височную эпилепсию; столбняк; синдром скрытой дизрафии спинного мозга; болезнь Томсена; синдром верхней апертуры грудной клетки; тригеминальную невралгию; паралич Тодда; синдром Туретта; токсическую энцефалопатию; транзиторную ишемическую атаку; формы трансмиссивной губчатой энцефалопатии; поперечный миелит; травматическое повреждение головного мозга; тремор; трихотилломанию; невралгию тройничного нерва; тропический спастический парапарез; трипаносомоз; туберозный склероз; синдром делеции 22q13; болезнь Унферрихта-Лундборга; вестибулярную шванному (невриному слухового нерва); болезнь фон Гиппеля-Линдау (VHL); вилюйский энцефаломиелит (VE); синдром Валленберга; синдром Веста; хлыстовую травму; синдром Вильямса; болезнь Вильсона; нарушение слуха, сцепленное с Y-хромосомой; и/или синдром Цельвегера.

[00253] При каждом из статусов, заболеваний, нарушений и состояний, описанных в данном документе, а также других, могут быть полезны композиции и способы, описанные в данном документе. Как правило, лечение статуса, заболевания, нарушения или состояния включает предупреждение или задержку появления клинических симптомов у млекопитающего, которое может быть поражено статусом, заболеванием, нарушением или состоянием или быть

предрасположенным к ним, но которое еще не испытывает или у которого еще не проявляются их клинические или субклинические симптомы. Лечение может также включать подавление статуса, заболевания, нарушения или состояния (*например*, остановку или ослабление развития заболевания или по меньшей мере одного его клинического или субклинического симптома). Кроме того, лечение может включать облегчение заболевания (*например*, обеспечение регрессии статуса, заболевания, нарушения или состояния или по меньшей мере одного из его клинических или субклинических симптомов). Польза для субъекта, подлежащего лечению, может быть статистически значимой либо по меньшей мере ощутимой для субъекта или врача.

[00254] Ассоциированное с митохондриями заболевание, нарушение или состояние может представлять собой заболевание, главным образом обусловленное или во вторую очередь ассоциированное с дисфункцией, фрагментацией или утратой слияния митохондрий или ассоциированное с дисфункцией каталитической активности или конформационным разворачиванием у MFN1 или MFN2. Дисфункция митохондрий может быть обусловлена генетическими мутациями генов митофузинов или других генов (кодируемых в ядре или митохондриях) или может быть обусловлена физическим, химическим или вызванным факторами окружающей среды поражением CNS или PNS.

[00255] В конкретном примере моторно-сенсорные нейропатии, индуцированные химиотерапией рака, можно предупреждать или лечить с помощью композиций по настоящему изобретению. Периферическая нейропатия, индуцированная химиотерапией, представляет собой одно из наиболее распространенных осложнений химиотерапии рака, поражающее 20% всех пациентов и почти 100% пациентов, получающих высокие дозы химиотерапевтических средств. Дозозависимая нейротоксичность двигательных и чувствительных нейронов может приводить к хронической боли, гиперчувствительности к тепловым, холодным и механическим раздражителям и/или ухудшению нейромышечного контроля. Наиболее распространенные химиотерапевтические средства, связанные с CIPN, представляют собой препараты платины, алкалоиды барвинка, таксаны, эпотилоны и нацеленный ингибитор протеасом бортезомиб.

[00256] CIPN наиболее часто поражает периферические чувствительные нейроны, клеточные тела которых расположены в ганглиях задних корешков спинного мозга, не имеющих гематоэнцефалического барьера, который защищает другие компоненты центральной и периферической нервной системы. Незащищенные нейроны ганглиев задних корешков спинного мозга являются более чувствительными к гипервозбудимости нейронов и активации врожденной иммунной системы, вызываемыми циркулирующими цитотоксическими химиотерапевтическими средствами. CIPN влияет на качество жизни и является потенциально инвалидизирующей, поскольку она вызывает хроническую нейропатическую боль, которая, как и другие причины невралгии (*например*, постгерпетической невралгии, диабетической мононейропатии), является рефрактерной к анальгетической терапии. Вовлечение двигательных нервов обычно проявляется как утрата мелкой моторики с ухудшением почерка, трудностями с застегиванием одежды на пуговицы или шитьем и иногда слабость верхних или нижних конечностей или утрата выносливости. CIPN, как правило, проявляется в течение нескольких недель после начала химиотерапии и во многих случаях улучшается после окончания химиотерапевтического лечения, хотя остаточная боль, сенсорные или двигательные дефекты наблюдаются у от одной трети до половины пораженных пациентов. К сожалению, введение доз средств химиотерапии, ограниченное CIPN, может приводить к задержкам, уменьшению или прерыванию лечения рака, что таким образом сокращает выживаемость.

[00257] Дисфункция митохондрий и окислительный стресс вовлечены в CIPN ввиду наблюдаемых ультраструктурных морфологических аномалий, нарушенной транскрипции и репликации митохондриальной ДНК, индукции митохондриальных путей апоптоза и уменьшения проявления экспериментальных признаков CIPN в результате упреждающей защиты митохондрий. Активаторы митофузина могут усиливать общую функцию митохондрий в поврежденных нейронах, увеличивать транспорт митохондрий в области повреждения нейронов и ускорять восстановление/регенерацию нейронов *in vitro* после повреждения, индуцированного химиотерапией. По этой причине полагают, что активаторы митофузина могут уменьшать поражение нейронов, вызванное химиотерапевтическими средствами при CIPN, и ускорять

регенерацию/восстановление нервов, поврежденных химиотерапевтическими противораковыми средствами. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены композиции и способы для лечения поражения нервов и нейропатии, индуцированных химиотерапией рака.

[00258] В другом примере поражение CNS или PNS (*например*, травму CNS или PNS, повреждение с размождением тканей, SCI, TBI, инсульт, повреждение зрительного нерва или связанные состояния, которые предусматривают разъединение аксонов) можно лечить с помощью композиций по настоящему изобретению. CNS включает головной мозг и спинной мозг, и PNS состоит из черепных, спинномозговых и вегетативных нервов, которые связаны с CNS.

[00259] Повреждение нервной системы, обусловленное механическими, термическими, химическими или ишемическими факторами, может приводить к нарушению различных функций нервной системы, таких как память, когнитивная деятельность, речь и произвольное движение. Чаще всего это происходит посредством случайного размождения или рассечения нервных путей или как непреднамеренное последствие медицинских вмешательств, при котором прерываются нормальные связи между клеточными телами нервов и их мишенями. Другие типы поражений могут включать могут включать нарушение взаимосвязей между нейронами и поддерживающими их клетками или разрушение гематоэнцефалического барьера.

[00260] Активаторы митофузина могут быстро обратить вспять нарушение подвижности митохондрий в нейронах у мышей или пациентов с различными генетическими или индуцированными химиотерапевтическими средствами нейродегенеративными заболеваниями, в аксонах, пораженных химиотерапевтическими средствами, и в аксонах, разъединенных в результате физического поражения. По этой причине активаторы митофузина могут усиливать регенерацию/восстановление физически поврежденных нервов, как в случае автомобильных и спортивных травм, проникающих травм вследствие военных или преступных действий и ятрогенных травм во время проведения инвазивных медицинских процедур. Таким образом, в настоящем изобретении предусмотрены композиции и способы для лечения физического поражения нервов.

[00261] Подвижность митохондрий также вовлечена в нейропатию и поражения с травматическим размождением или разделением нервов. После разрыва нервов или их повреждения с размождением тканей нервы либо будут регенерировать и восстанавливать нервно-мышечную функцию, либо будут неспособны регенерировать, так что нервно-мышечная функция необратимо нарушается. Активаторы митофузина могут увеличивать транспорт митохондрий, тем самым обеспечивая регенерацию нерва после травматических поражений.

[00262] Количество активатора митофузина и вспомогательного вещества для получения композиции в указанной лекарственной форме может варьироваться в зависимости от субъекта, получающего лечение, состояния, лечение которого осуществляется, и конкретного способа введения. Следует принять во внимание, что единичное содержание активатора митофузина, содержащегося в отдельной дозе указанной лекарственной формы, само по себе не обязательно может составлять терапевтически эффективное количество, поскольку необходимое терапевтически эффективное количество может быть достигнуто путем введения ряда отдельных доз, или терапевтический эффект может накапливаться с течением времени.

[00263] Введение доз активаторов митофузина по настоящему изобретению может происходить как единичное событие или в течение периода курса лечения. Например, активатор митофузина можно вводить ежедневно, еженедельно, раз в две недели или ежемесячно. Для лечения острых состояний период курса лечения может составлять по меньшей мере несколько дней, при этом введение доз происходит по меньшей мере один раз в день или непрерывно. При определенных состояниях лечение может длиться от нескольких дней до нескольких недель. Например, лечение может длиться в течение одной недели, двух недель или трех недель. При хронических состояниях лечение может длиться от нескольких недель до нескольких месяцев или даже лет.

[00264] Токсичность и терапевтическая эффективность композиций, описанных в данном документе, может быть определена посредством стандартных фармацевтических процедур для культур клеток или экспериментальных животных для определения LD₅₀ (дозы, летальной для 50% популяции) и ED₅₀ (дозы, терапевтически эффективной для 50% популяции). Соотношение доз между

токсическим и терапевтическим эффектами представляет собой терапевтический индекс, который можно выразить как соотношение LD_{50}/ED_{50} , где более высокие терапевтические индексы обычно считаются в данной области техники оптимальными.

[00265] Если не указано противоположное, числовые параметры, представленные в следующем описании и прилагаемой формуле изобретения, являются приблизительными значениями, которые могут варьироваться в зависимости от желаемых свойств, которые стремятся получить с помощью вариантов осуществления настоящего изобретения. В крайнем случае, а не в качестве попытки ограничить применение доктрины эквивалентов объемом формулы изобретения, каждый числовой параметр должен по меньшей мере истолковываться с учетом количества приведенных значащих цифр и путем применения обычных методик округления.

[00266] Один или более иллюстративных вариантов осуществления, включающих различные признаки, представлены в данном документе. В целях ясности в настоящей заявке описаны или показаны не все особенности физической реализации. Следует понимать, что при разработке физического варианта осуществления, включающего варианты осуществления настоящего изобретения, для достижения целей разработчика должны быть приняты многочисленные решения, специфичные для реализации, такие как соблюдение системных, связанных с бизнесом, связанных с правительством и других ограничений, которые варьируются в зависимости от реализации и время от времени. Хотя усилия разработчика могут быть времязатратными, такие усилия, тем не менее, будут обычной деятельностью для специалистов средней квалификации в данной области, пользующихся настоящим изобретением.

[00267] Хотя различные системы, инструменты и способы описаны в данном документе как «содержащие» различные компоненты или стадии, системы, инструменты и способы также могут «по существу состоять из» или «состоять из» различных компонентов и стадий.

[00268] Используемая в данном документе фраза «по меньшей мере один из», предшествующая ряду объектов, где термины «и» или «или»

предназначены для отделения любого из объектов, модифицирует перечень в целом, а не каждый элемент перечня (т. е. каждый объект). Фраза «по меньшей мере один из» допускает значение, которое включает по меньшей мере один из любого из объектов, и/или по меньшей мере один из любой комбинации объектов, и/или по меньшей мере один из каждого из объектов. В качестве примера, каждая из фраз «по меньшей мере один из А, В и С» или «по меньшей мере один из А, В или С» относится к только А, только В или только С; любой комбинации А, В и С и/или по меньшей мере одному из каждого из А, В и С.

[00269] Следовательно, раскрытые системы, инструменты и способы хорошо адаптированы для достижения упомянутых целей и преимуществ, а также тех, которые являются их неотъемлемой частью. Конкретные варианты осуществления, раскрытые выше, являются только иллюстративными, поскольку идеи настоящего изобретения могут быть модифицированы и реализованы на практике различными, но эквивалентными способами, очевидными для специалистов в данной области, использующих преимущества приведенных в данном документе идей. Кроме того, не предполагается никаких ограничений в отношении подробностей конструкции или разработки, показанных в данном документе, за исключением тех, которые описаны в формуле изобретения ниже. Таким образом, очевидно, что конкретные иллюстративные варианты осуществления, раскрытые выше, могут быть изменены, объединены или модифицированы, и все такие варианты рассматриваются в пределах объема настоящего изобретения. Системы, инструменты и способы, иллюстративно раскрытые в данном документе, могут быть надлежащим образом реализованы на практике при отсутствии какого-либо элемента, который конкретно не раскрыт в данном документе, и/или любого дополнительного элемента, раскрытого в данном документе. Хотя системы, инструменты и способы описываются как «предусматривающие», «содержащие» или «включающие» различные компоненты или стадии, системы, инструменты и способы также могут «по существу состоять из» или «состоять из» различных компонентов и стадий. Все числа и диапазоны, раскрытые выше, могут варьироваться на некоторое количество. Всякий раз, когда раскрывается числовой диапазон с нижним пределом и верхним пределом, конкретно раскрывается любое число и любой включенный диапазон, попадающий

в пределы данного диапазона. В частности, каждый диапазон значений (в форме «от приблизительно а до приблизительно b», или, что эквивалентно, «от примерно а до b», или, что эквивалентно, «примерно а—b»), раскрытый в данном документе, следует понимать как представляющий каждое число и диапазон, охватываемые более широким диапазоном значений. Также, термины в формуле изобретения имеют свое общепринятое обычное значение, если иное явно и ясно не определено патентообладателем. Более того, формы единственного числа, используемые в формуле изобретения, определены в данном документе как означающие один или более чем один из элементов, которые они вводят. Если существует какое-либо противоречие в вариантах употребления слова или термина в настоящем описании и одном или более патентах или других документах, которые могут быть включены в данный документ посредством ссылки, следует принять определения, которые согласуются с настоящим описанием.

[00270] Все публикации и патентные документы, цитируемые в данном документе, включены в данный документ посредством ссылки, как если бы каждая такая публикация или документ была конкретно и индивидуально указана как включенная в данный документ посредством ссылки. Цитирование публикаций и патентных документов не предполагается как признание того, что какие-либо из них относятся к предшествующему уровню техники, а также не составляет какое-либо признание в отношении их содержания или даты. Поскольку настоящее изобретение было описано здесь посредством письменного описания, специалисты в данной области поймут, что настоящее изобретение может быть реализовано на практике во множестве вариантов осуществления, и что приведенное выше описание и приведенные ниже примеры предназначены для целей иллюстрации, а не для ограничения нижеследующей формулы изобретения.

ПРИМЕРЫ

Иллюстративные материалы и способы

Линии клеток

[00271] MEF дикого типа получали из эмбрионов мышей E10.5 c57/bl6. Иммуортиализованные Т-антигеном SV-40 нулевые по MFN1 (CRL-2992), нулевые по MFN2 (CRL-2993) и двойные нулевые по MFN1/MFN2 (CRL-2994) MEF

приобретали в АТСС. MEF субкультивировали в DMEM (4,5 г/л глюкозы) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки, 1× заменимых аминокислот, 2 мМ L-глутамина, 100 единиц/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина.

Конфокальные исследования митохондрий на живых клетках

[00272] Визуализацию живых клеток проводили на флуоресцентном микроскопе Olympus Diaphot 200, оснащенный водноиммерсионным объективом 60×. Все живые клетки выращивали на покрытых 12-луночных планшетах со стеклянным дном и исследовали в модифицированном буфере Кребса-Хенселейта (138 мМ NaCl, 3,7 мМ KCl, 1,2 мМ K₂HPO₄, 15 мМ, 20 мМ HEPES и 1 мМ CaCl₂) при комнатной температуре.

[00273] Клетки возбуждали лазерными диодами с длиной волны 408 нм (Hoechst), 561 нм (MitoTracker зеленый и кальцеин AM, GFP) или 637 нм (TMRE, MitoTracker оранжевый, гомодимер этидия-1 и AF594-декстран). Для исследований удлинения митохондрий соотношение размеров митохондрий (длинная ось/короткая ось) рассчитывали с применением автоматизированного обнаружения краев и программного обеспечения Image J. Деполяризацию митохондрий рассчитывали в виде процентной доли зеленых митохондрий, визуализированных на совмещенных изображениях с MitoTracker зеленым и TMRE, выраженной как зеленые/(зеленые + желтые митохондрии) × 100.

Линии мышей

[00274] Трансгенных мышей SOD1-Gly93Ala (G93A) (B6SJL-Tg(SOD1*G93A)1Gur/J) и мышей C57BL/6J приобретали у The Jackson Laboratory (Бар-Харбор, Мэн, США; инвентарный №: 002726, инвентарный №: 000664).

Культивируемые клетки

[00275] *Непосредственно перепрограммированные двигательные нейроны человека* получали из дермальных фибробластов человека согласно описанному (Abernathy DG, Kim WK, McCoy MJ, Lake AM, Ouwenga R, Lee SW, et al. MicroRNAs Induce a Permissive Chromatin Environment that Enables Neuronal Subtype-Specific Reprogramming of Adult Human Fibroblasts. Cell Stem Cell. 2017;21(3):332-348.e9; Franco A, Dang X, Walton EK, Ho JN, Zablocka B, Ly C, et al.

Burst mitofusin activation reverses neuromuscular dysfunction in murine CMT2A. *Elife*. 2020;9:e61119). Нейроны ганглиев задних корешков спинного мозга (DRG) взрослых мышей получали из трансгенных мышей C57BL/6J или SOD1G93A в возрасте 8-12 недель согласно описанному (Franco A, Dang X, Walton EK, Ho JN, Zablocka B, Ly C, et al. Burst mitofusin activation reverses neuromuscular dysfunction in murine CMT2A. *Elife*. 2020;9:e61119).

ПЦР-генотипирование мутаций в фибробластах пациентов с ALS и FTD

[00276] ДНК экстрагировали из 5 x 10⁶ первичных фибробластов человека с помощью набора для выделения ДНК из крови и тканей DNeasy (Qiagen, № по каталогу: 69506) в соответствии с протоколом производителя. Проводили ПЦР представляющих интерес фрагментов генов *SOD1*, *TDP43* и *FUS* (начальная денатурация при 95 градусах С в течение 5 мин, затем 30 следующих циклов: денатурация: 95 градусов С, 30 с, отжиг: 55 градусов С, 30 с, элонгация: 72 градуса С, 30 с, конечная элонгация при 68 градусах С в течение 5 мин, затем выдерживание при 4 градусах С) с применением 2X мастер-микса Taq Plus (№ по каталогу: BETAQR-L, Bullseye), 50 нг геномной ДНК-матрицы и следующих праймеров:

ALS:

SOD1 L38V-прямой праймер 5'-СТТCACTGTGAGGGGTAAGG-3'

SOD1 L38V-обратный праймер 5'-CTAGGGTGAACAAGTATGGG-3'

SOD1 I113T-прямой праймер 5'-TGTTTAGTGGCATCAGCCCT-3'

SOD1 I113T-обратный праймер 5'-ACCGCGACTAACAATCAAAGTG-3'

SOD1 L145F-прямой праймер 5'-GGTAGTGATТАCTTGACAGCCCAA-3'

SOD1 L145F-обратный праймер 5'-GTТАAGGGGCCTCAGACTACAT-3'

TDP43 A382T-прямой праймер 5'-AACATGCAGAGGGAGCCAAA-3'

TDP43 A382T-обратный праймер 5'-ACCCTGCATTGGATGCTGAT-3'

FUS R521G-прямой праймер 5'-ТАCTCGCTGGGTTAGGTAGGA-3'

FUS R521G-обратный праймер 5'-ACGAGGGTAACAСТGGGTACA-3'

Лобно-височная деменция:

PGRN M1L и A9D-прямой праймер 5'-GGGGCTAGGGTACTGAGTGA-3'

PGRN M1L и A9D-обратный праймер 5'-TGGCCAATCCAAGATGACCC-3'

MAPT R406W-прямой праймер 5'-CTTTCTCTGGCACTTCATCTC-3'

MAPT R406W-обратный праймер 5'-CCTCTCCACAATTATTGACCG-3'

Продукты ПЦР очищали с применением набора для быстрой экстракции из геля PureLink (Invitrogen, № по каталогу: K21000-12) и отправляли в GENEWIZ для секвенирования по Сэнгеру.

Препаративная HPLC

[00277] Очистку проводили с применением HPLC (H₂O-MeOH, системы Agilent 1260 Infinity, оснащенные DAD и масс-детекторами. Для разделения использовали препаративную колонку Waters SunFire C18 OBD, 100 Å, 5 мкм, 19 мм × 100 мм с защитным картриджем для препаративных колонок SunFire C18, 100 Å, 10 мкм, 19 мм × 10 мм). Материал растворяли в 0,7 мл DMSO. Скорость потока: 30 мл/минута. Чистоту полученных фракций проверяли с помощью аналитической LCMS. Спектры регистрировали для каждой фракции, полученной сразу после хроматографии в форме раствора. Растворитель выпаривали в потоке N₂ при 80° С. На основании анализа методом LCMS после хроматографии фракции объединяли. Твердые фракции растворяли в 0,5 мл MeOH и переносили в предварительно взвешенные помеченные флаконы. Полученные растворы снова выпаривали в потоке N₂ при 80°С. После высушивания определяли характеристики продуктов с помощью LCMS, ¹H-ЯМР и ¹³C-ЯМР.

HPLC/HRMS (ESI)

[00278] Анализ методом LC/MS проводили с применением системы LC/MSD Agilent серии 1100 с DAD/ELSD и масс-спектрометром Agilent LC/MSD VL (G1956A), SL (G1956B) или системы LC/MSD Agilent серии 1200 с DAD/ELSD и масс-спектрометром Agilent LC/MSD SL (G6130A), SL (G6140A). Все данные LC/MS получали с помощью переключения положительного/отрицательного режима. Соединения разделяли с помощью картриджа для быстрого разделения Zorbax SB-C18, 1,8 мкм, 4,6 × 15 мм (PN 821975-932) в подвижной фазе (А—ACN, 0,1% муравьиной кислоты; В—вода (0,1% муравьиной кислоты)). Скорость потока:

3 мл/минута; градиент 0 минут—100% В; 0,01 минуты—100% В; 1,5 минуты—0% В; 1,8 минуты—0% В; 1,81 минуты—100% В; объем введения 1 мкл; режим ионизации — химическая ионизация при атмосферном давлении (APCI), диапазон сканирования масса/заряд 80-1000.

Статистические методы

[00279] Данные о динамике и дозозависимом эффекте рассчитывали для каждого исследования с использованием GraphPad Prism. Все данные приведены в виде среднего значения \pm SEM. Для статистических сравнений (двусторонних) использовали односторонний ANOVA и критерии Тьюки для нескольких групп или t-критерий Стьюдента для попарных сравнений. Результаты при $p < 0,05$ считали значимыми. Фармакокинетические анализы активаторов митофузина *in vitro* проводили в WuXi Apptec Co. Ltd.

[00280] Связывание с белками плазмы крови человека и мыши CD-1 измеряли с применением равновесного диализа. В качестве матрицы тестирования использовали объединенные отдельные замороженные образцы плазмы крови мыши и человека с антикоагулянтом EDTA. В качестве положительного контроля использовали варфарин. Тестируемые соединения добавляли в холостую матрицу в конечной концентрации 2 мкМ. Аликвоту образца матрицы объемом 150 мкл добавляли на одну сторону камеры в 96-луночной планшете для равновесного диализа (HTDialysis), и равный объем буфера для диализа добавляли на другую сторону камеры. Аликвоту образца матрицы собирали перед инкубацией и использовали в качестве образцов T_0 для расчета извлечения. Инкубации проводили в трех повторностях. Планшет для диализа помещали в увлажненный инкубатор и медленно вращали в течение четырех часов при 37°C. После инкубации отбирали образцы со стороны матрицы, а также со стороны буфера. Образец плазмы крови сопоставляли с равным объемом холостого буфера; и образцы буфера сопоставляли с равным объемом холостой плазмы крови. Образцы, сопоставляемые с матрицей, гасили останавливающим раствором, содержащим внутренний стандарт. Все образцы анализировали с помощью LC-MS/MS. Все концентрации тестируемых соединений в образцах матрицы и буфера выражены в виде соотношений площадей пиков (PAR) аналита и внутреннего стандарта.

[00281] Стабильность *in vitro* измеряли в микросомах печени человека и мыши. Раствор промежуточного соединения (100 мкМ малой молекулы) изначально получали в метаноле и затем использовали для получения рабочего раствора. Это достигали посредством стадии 10-кратного разбавления раствора промежуточного соединения в 100 мМ калий-фосфатном буфере. По десять микролитров рабочего раствора соединения или контрольного рабочего раствора добавляли во все лунки 96-луночного планшета в следующие моменты времени (минуты): T₀, T₅, T₁₀, T₂₀, T₃₀, T₆₀, NCF60, кроме холостой матрицы. Раствор микросом (680 мкл/лунка) (№ 452117, Corning; Вуберн, Массачусетс, США; № R1000, Xenotech; Канзас-Сити, Канзас, США, и № M1000, Xenotech; Канзас-Сити, Канзас, США) распределяли в 96-луночный планшет в качестве резервуара в соответствии с картой планшета. Затем в каждый планшет добавляли 80 мкл/лунка с помощью ADDA (двуручной системы Apricot Design, Apricot Designs, Inc., Ковина, Калифорния, США), и смесь раствора микросом и соединения оставляли для инкубации при 37°C в течение приблизительно 10 минут. Затем 10 мкл 100 мМ калий-фосфатного буфера/лунка добавляли к NCF60 и инкубировали при 37°C (запускали таймер на 1 ч.). После предварительного нагревания 90 мкл/лунка системы регенерации NADPH (№ 00616, Sigma-Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) распределяли в 96-луночный планшет в качестве резервуара в соответствии с картой планшета. Затем в каждый планшет добавляли 10 мкл/лунка с помощью ADDA для начала реакции. Для прекращения реакции использовали 300 мкл/лунка останавливающего раствора (холодного при 4°C, содержащего 100 нг/мл толбутамида и 100 нг/мл лабеталола в качестве внутренних стандартов), и содержимое планшетов для отбора образцов взбалтывали в течение примерно 10 минут. Затем образцы центрифугировали при 4000 об./мин в течение 20 минут при 4°C. Образцы надосадочной жидкости анализировали с помощью LC-MS/MS.

Параллельный анализ проницаемости искусственной мембраны (ПАМПА)

[00282] 10 мкМ раствора малой молекулы в 5% DMSO (150 мкл) добавляли в каждую лунку донорного планшета, мембрана из PVDF в котором была предварительно покрыта с помощью 5 мкл смеси 1% экстракта полярных липидов головного мозга (свиньи)/додекана. Затем 300 мкл PBS добавляли в каждую лунку акцепторного планшета из PTFE. Содержимое донорного планшета

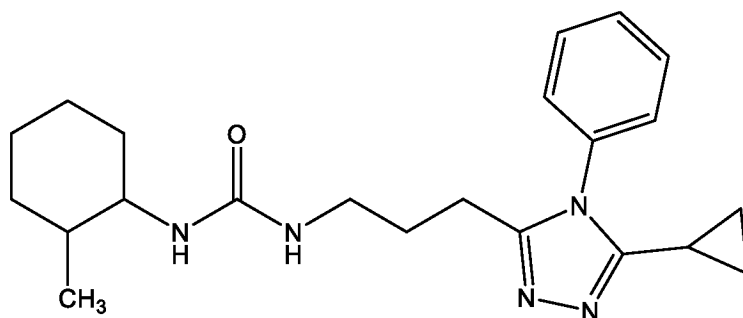
и акцепторного планшета объединяли и инкубировали в течение 4 часов при комнатной температуре со встряхиванием при 300 об./мин. Для получения образца T₀ 20 мкл донорного раствора переносили в новую лунку с последующим добавлением 250 мкл PBS (DF: 13,5) и 130 мкл ACN (содержащего внутренний стандарт) в качестве образца T₀. Для получения акцепторного образца планшет удаляли из инкубатора, и 270 мкл раствора переносили из каждой акцепторной лунки и смешивали с 130 мкл ACN (содержащего внутренний стандарт) в качестве акцепторного образца. Для получения донорного образца 20 мкл раствора переносили из каждой донорной лунки и смешивали с 250 мкл PBS (DF: 13,5), 130 мкл ACN (содержащего внутренний стандарт) в качестве донорного образца. Акцепторные образцы и донорные образцы анализировали с помощью LC-MS/MS.

Другие способы

[00283] Анализы методом HPLC проводили с помощью колонки Kinetex C18 (4,6 X 50 мм, 5 мкм; подвижная фаза А: 0,0375% TFA в воде (об./об.), В: 0,01875% TFA в ацетонитриле (об./об.)), работающей при 50°C с оптическим поглощением при 200 нм.

[00284] LC-MS/MS (ESI) проводили с применением 2 систем: 1) SHIMADZU LC-MS-2020 с программным обеспечением для анализа LabSolution V5.72 и колонкой CHROMALITH@FLASH RP-18E, 25*2,0 мм, работающей при 50°C с детектором PDA (220 и 254 нм), данные получали в режиме сканирования MS (положительный режим) с диапазоном сканирования масса/заряд = 100-1000, поток осушающего газа (N₂): 15 л/мин, напряжение DL: 120 В и напряжение DC Quagry: 20 В, или 2) прибора Agilent 1200/G6110A с программным обеспечением Agilent ChemStation версии В. 04.03 и колонкой XBRIDGE C18, 2,1*50 мм, работающей при 40°C, с детектором DAD (220 нм)/ELSD, данные получали в режиме сканирования MS (положительный режим) с диапазоном сканирования масса/заряд = 100-1000, поток осушающего газа (N₂): 10 л/мин, 350°C, давление распылителя: 35 фунт/кв. дюйм, напряжение на капилляре: 2500 В. ЯМР-спектроскопию проводили на AVANCE NEO от Bruker, 400 МГц, с зондом PABBO BB/19F-1H/D Z-GRD на 5 мм.

[00285] Дозозависимый эффект фузогенности агонистов митофузина определяли на MEF с дефицитом Mfn1 или Mfn2 (MEF Mfn1-KO или Mfn2-KO), культивируемых при 37°C и в 5% CO₂/95% воздуха. Клетки высевали в день 1 в 6-луночные планшеты при плотности 2 x 10⁴ клеток на лунку, и соединения добавляли в 9 концентрациях (0,5 нМ - 10 μМ, растворенные в DMSO) в течение ночи. Затем митохондрии окрашивали с помощью MitoTracker оранжевого (200 нМ; M7510; Invitrogen, Карлсбад, Калифорния, США). Ядра окрашивали с помощью Hoechst (10 мкг/мл; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, № по каталогу: H3570). Изображения получали при комнатной температуре на конфокальном микроскопе Nikon Ti с применением масляно-иммерсионного объектива 60X 1,3 NA в буфере Кребса-Хенселейта (138 NaCl, 3,7 нМ KCl, 1,2 нМ KН₂PO₄, 15 нМ глюкозы, 20 нМ HEPES, pH: 7,2-7,5 и 1 мМ CaCl₂). Имело место возбуждение лазером при 549 нм с испусканием при 590 нм для MitoTracker оранжевого и возбуждение при 306 нм с испусканием при 405 нм для Hoechst. Изображения анализировали с применением ImageJ, и фузогенность количественно определяли как соотношение размеров митохондрий (длина/ширина) и индексировали по отношению к максимальному ответу, вызываемому соединением 6 — известным активатором митофузина. Кривые ответа интерполировали с помощью сигмоидальной модели с применением программного обеспечения Prism 8. Значения EC₅₀ приведены в виде среднего значения с границами 95% доверительного интервала для по меньшей мере 3 независимых экспериментов.



Соединение 6

1-(3-(5-циклопропил-4-фенил-4H-1,2,4-триазол-3-ил)пропил)-3-(2-метилциклогексил)мочевина

[00286] Функциональное оценивание активации митофузина при деполяризации митохондрий исследовали следующим образом. Культивируемые

MEF Mfn2-КО или Mfn1-КО обрабатывали с помощью DMSO или соединений 2A, 2B или 6 (1 мкМ) в течение 24 часов, затем окрашивали с помощью этилового сложного эфира тетраметилпродамина (TMRE, 200 нМ, Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, № по каталогу: T-669), MitoTracker зеленого (200 нМ; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, № по каталогу: M7514) и Hoechst (10 мкг/мл; Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, № по каталогу: H3570) в течение 30 мин при 37°C в 5% CO₂/95% воздуха, промывали дважды в PBS. Изображения получали при комнатной температуре на конфокальном микроскопе Nikon Ti с применением масляно-иммерсионного объектива 60 X 1,3 NA в буфере Кребса-Хенселейта (138 NaCl, 3,7 нМ KCl, 1,2 нМ KН₂PO₄, 15 нМ глюкозы, 20 нМ HEPES, pH: 7,2-7,5 и 1 mM CaCl₂): возбуждение лазером имело место при 488 нм с испусканием при 510 нм для MitoTracker зеленого, 549 нм с испусканием при 590 нм для TMRE и 306 нм с испусканием при 405 нм для Hoechst. Деполяризацию митохондрий приводили в виде % количества зеленых митохондрий/количество желтых + зеленых митохондрий с применением Image J.

[00287] Фармакокинетические анализы *in vitro* проводили в двух повторностях с применением стандартных способов WuXi AppTec Co. Ltd. (Шанхай, Китай). Связывание с белками плазмы крови измеряли с помощью равновесного диализа; % связанного = $(1 - [\text{количество свободного соединения в диализате}] / [\text{общее количество соединения в ретентате}]) \times 100$. Стабильность в плазме крови 2 мкМ соединений в осветленной плазме крови, прошедшей цикл замораживания-размораживания, оценивали с помощью LC-MS/MS образцов надосадочной жидкости после осаждения белков; для исследований приведены данные за 120 мин, включая 0, 10, 30, 60 и 120 мин. Стабильность в микросомах печени 1 мкМ соединений в микросомах печени (0,5 мг/мл) оценивали через 0, 5, 10, 20, 30, 60 мин инкубации с помощью LC/MS/MS экстрактов реакционной смеси. Анализ пассивной проницаемости искусственной мембраны гематоэнцефалического барьера (PAMPA-BBB) проводили с применением 150 мкл 10 мкМ соединений (5% DMSO), добавленных на мембраны из PVDF, предварительно покрытые с помощью 5 мкл 1% смеси экстракта полярных липидов головного мозга (свиньи)/додекана, и инкубируемых в течение 4 ч. при

комнатной температуре со встряхиванием при 300 об./мин. Донорные и акцепторные образцы анализировали с помощью LC-MS/MS.

[00288] Фармакокинетические анализы *in vivo* проводили в трех повторностях с применением стандартных способов WuXi AppTec Co. Ltd. (Шанхай, Китай). Соединения (5 мг/мл) растворяли в 10% DMSO/90% (30% циклодекстрина) и вводили путем перорального введения (50 мг/кг) самцам мышей CD-1 в возрасте 7-9 недель (SLAC Laboratory Animal Co. Ltd., Шанхай, Китай или SIPPR/BK Laboratory Animal Co. Ltd., Шанхай, Китай). Данные о концентрации в плазме крови, головном мозге, спинном мозге и седалищном нерве в зависимости от времени анализировали с помощью некомпартментных подходов с применением программы из системы программного обеспечения Phoenix WinNonLin 6.3, при этом данные представлены как среднее значение от 3 мышей для каждого условия.

[00289] Фармакокинетические анализы *in vivo* и *in vitro* с использованием тканей мыши и человека были одобрены институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию Шанхайского исследовательского центра (IACUC-SH) (корпоративным комитетом WuXi по этике исследований на животных (WX-CCARE)) и выполнены WuXi AppTec Co. Ltd. (Шанхай, Китай). 2 мг/мл соединений диспергировали в растворе 10% DMSO/90% (30% циклодекстрина) и вводили самцам мышей CD-1 в возрасте 7-9 недель от SIPPR/BK Laboratory Animal Co. Ltd., Шанхай, Китай (15 мышей на соединение) в хвостовую вену (10 мг/кг) или подкожно с помощью осмотического мини-насоса (60 мг/кг/день x три дня).

Исследования in vivo на мышцах с ALS (SOD1G93A)

[00290] *План эксперимента* – самцов и самок мышей SOD1-G93A с ALS в возрасте 60 дней рандомизировали для обработки соединением 2 (60 мг/кг РО дважды в день) или той же средой-носителем (10% Me2SO/90% (30% 2-гидроксипропил)-β-циклодекстрина [HP-b-CD; Sigma, № по каталогу: 332607]) (исследование соединения 2A). Лекарственные средства и среду-носитель подвергали стерилизующей фильтрации (PVDF на 0,22 мкм, № SLGV033RS, Millipore, Корк, Ирландия), и LZ подготавливали и назначали мышам шприцы в соответствии с таблицей рандомизации. Лекарственные средства вводил мышам

XD, работающий в слепом режиме относительно генотипа мышей и группы обработки. Поведенческое и нейрофизиологическое тестирование проводили до начала терапии и каждые 10 дней после начала терапии.

[00291] *Тестирование с вращающимся стержнем* проводили с применением вращающегося стержня от Ugo Basile (Джемонио, Италия; № 47650). После первоначального обучения при постоянной скорости 5 об./мин исследования проводили с ускорением от 5 до 40 об./мин в течение 120 секунд, затем поддерживали 40 об./мин. Мышей тестировали 5 раз, и приводили среднее время до появления нежелательного события (когда мышь падала с устройства).

[00292] *При тестировании обратной хватки* мышей помещали в центр плотной плетеной сетки в овальной металлической рамке, которую переворачивали в течение 2 с и поддерживали на высоте 40-50 см над дном клетки, пока мыши не падали (время до появления нежелательного события). Исследования повторяли три раза, и приводили среднее время до появления нежелательного события.

[00293] *Для определения комбинированного балла нейромышечной дисфункции* применяли систему, описанную Guyenet et al.

[00294] *Тест ходьбы по перекладине*: балл 0 (норма) = эффективно использует задние лапы при ходьбе по перекладине клетки; балл 1 = иногда теряет устойчивое положение при ходьбе по перекладине, но выглядит скоординированно; балл 2 = не использует задние лапы эффективно; балл 3 = отказывается передвигаться по перекладине или падает при ходьбе; *схватывание задними конечностями*: балл 0 (норма) = задние конечности полностью развернуты наружу при поднятии за хвост; балл 1 = одна задняя конечность частично опущена к животу; балл 2 = обе задние конечности частично опущены к животу; балл 3 = задние конечности полностью касаются живота; *походка*: балл 0 = нормальная походка; балл 1 = тремор или хромота; балл 2 = ступни направлены от тела при ходьбе; балл 3 = трудности с продвижением вперед; *кифоз*: балл 0 (норма) = способен выпрямить спину при ходьбе, отсутствие кифоза; балл 1 = имеется легкий кифоз, но способен выпрямить спину; балл 2 = не способен выпрямить спину при легком кифозе; балл 3 = тяжелый кифоз при ходьбе и сидении. Результаты каждого

теста суммировали с получением комбинированного балла нейромышечной дисфункции.

[00295] *Нейроэлектрофизиологические регистрации электрически вызванного ответа мышцы у большеберцовой/икроножной мышцы (СМАР).* Мышей анестезировали изофлураном, брили, и им вводили игольчатый электрод для стимуляции проксимальных частей седалищных нервов (импульсы 3,9 мВ; продолжительность 0,002 мс). Кольцевые электроды устанавливали в средней части передней конечности для регистрации СМАР с помощью прибора Viasys Healthcare Nicolet Biomedical (Миддлтон, Висконсин, США № по каталогу: OL060954) с применением программного обеспечения Viking Quest версии 11.2. Оптимальное положение стимулирующего электрода определяли как то, которое обеспечивало наибольшую амплитуду СМАР; регистрировали и усредняли 3-4 независимых события.

[00296] *Исследования выживаемости.* Мышей наблюдали, пока уровень нейромышечной дисфункции не достигал предварительно определенной конечной точки, когда они не могли выпрямиться в течение 30 секунд после того, как их положили на спину.

[00297] *Исследования конечных точек, не относящихся к выживаемости,* прекращали после заключительного тестирования в предварительно определенном возрасте 140 дней. В ходе 140-дневных исследований образцы седалищного и средней части большеберцового нервов, икроножных мышц и поясничного отдела спинного мозга собирали и либо замораживали при оптимальной температуре резания (ОСТ, Tissue-ТЕК, № по каталогу: 4583), либо фиксировали в 4% PFA/PBS в течение 2 часов, переносили в 30% сахарозу/PBS на ночь при 4 градусах С и заливали в парафин. Срезы нервов окрашивали толуидиновым синим или подвергали иммуномечению с помощью 4-HNE (1:200 в 10% козьей сыворотке крови, к. т., 0,5 часа, № по каталогу Abcam: ab46545) и b-тубулина III (1:200 в 10% козьей сыворотке крови, к. т., 0,5 часа, № по каталогу Biolegend: 801201). Срезы икроножных мышц метили конъюгированным с флуоресцеином агглютинином зародышей пшеницы (WGA, № по каталогу: W834, Invitrogen) для мечения мембран миоцитов и 4-HNE для мечения ROS в течение 30 мин при комнатной температуре.

[00298] Для окрашивания нейромышечных соединений (NMJ) использовали замороженные срезы икроножной мышцы толщиной 10 мкм

[00299] согласно описанному (34). Вкратце, замороженные срезы фиксировали в предварительно охлажденном (-20 градусов C) растворе в течение 10 минут при к. т., блокировали 10% козьей сывороткой крови в течение 15 мин и окрашивали с помощью антитела к COXIV (1:200 в 10% козьей сыворотке крови, 4 градуса C, в течение ночи, № по каталогу: ab16056, Abcam), и метили нейронные синапсы с помощью а-бугаротоксина (0,5 мкг/мл в 10% козьей сыворотке крови, к. т., 1 час, № по каталогу: B-13423, Thermo Fisher Scientific).

[00300] Для двойного окрашивания COX/SDH в замороженных срезах икроножной мышцы толщиной 10 мкм использовали набор VitroView™ для двойного гистохимического окрашивания COX-SDH (№ по каталогу: VB-3022, VitroVivo Biotech) в соответствии с протоколом производителя.

[00301] При трансмиссионной электронной микроскопии и окрашивании толудиновым синим использовали стандартные методики.

[00302] Для окрашивания методом TUNEL в образцах спинного мозга мышей использовали флуорометрическую систему TUNEL DeadEnd (№ по каталогу: G3250, Promega) в соответствии с инструкциями производителя. Вкратце, образцы поясничного отдела спинного мозга фиксировали в 4% PFA в течение ночи и заливали в парафин перед изготовлением срезов. После проведения депарафинизации предметные стекла погружали в 0,1% TritonX-100 на 15 мин, промывали дважды с помощью PBS, переносили в 100 мкл уравнивающего буфера на 10 минут и затем подвергали реакции с 50 мкл реакционной смеси с TdT в течение 60 мин при 37 градусах C. Реакцию останавливали с помощью 2 X SSC в течение 15 мин, после чего промывали три раза с помощью PBS. Окрашивание антителом к b-тубулину III использовали для мечения нейронов.

[00303] Митохондриальное дыхание в перепрограммированных двигательных нейронах при ALS измеряли в виде скорости потребления кислорода (OCR) с использованием анализатора внеклеточного потока Seahorse XFe24 (Seahorse Bioscience, Биллерика, Массачусетс, США). Вкратце, нейроны высевали на луночный микропланшет для культуры клеток Seahorse XF24 (№ по каталогу:

100777-004, Agilent), обрабатывали с помощью Chimera, или соединения 2A (100 нМ), или среды-носителя DMSO, и спустя 48 часов измеряли митохондриальную OCR. Перед анализами картриджи датчиков (№ по каталогу: 102340-100, Agilent) гидратировали калибрантом XF (1 мл/лунка, № по каталогу: 100840-000, Agilent) в инкубаторе без CO₂ при 37 градусах С в течение ночи. Нейроны промывали 2 раза в среде DMEM для анализа Seahorse XF (№ по каталогу: 103680-100, Agilent), дополненной 1 мМ пирувата (№ по каталогу: 103578-100, Agilent), 2 мМ глутамин (№ по каталогу: 103579-100, Agilent) и 10 мМ глюкозы (№ по каталогу: 103577-100, Agilent); после заключительного промывания добавляли 500 мкл среды для анализа, и клетки инкубировали в инкубаторе без CO₂ при 37 градусах С в течение 1 часа. После четырех измерений базального дыхания в экспериментальные лунки автоматически вводили 1 мкМ олигомицина (ингибитора АТФ-синтазы), 1 мкМ FCCP (оптимизированная концентрация для обеспечения максимальной дыхательной способности), 0,5 мкМ ротенона/антимицина А (набор для тестового анализа Seahorse XF Cell Mito Stress, № по каталогу: 103010-100, Agilent). АТФ-связанное дыхание представляет собой уменьшение скорости потребления кислорода относительно базального дыхания после введения ингибитора синтеза АТФ олигомицина, при этом данные приведены в виде разности базальной OCR и OCR после введения олигомицина для каждой лунки. Каждый столбец в эксперименте представляет собой среднее значение для минимум 5 дублирующих лунок, и каждый эксперимент проводили с минимум тремя биологическими повторностями.

[00304] Токсичность соединения 2A оценивали на самках мышей C57BL6/J в возрасте 12 недель (The Jackson Laboratory, Бар-Харбор, Мэн, США, инвентарный №: 000664), которые получали 60 мг/кг соединения 2A в 10% DMSO/90% (30% HP-b-CD) или среду-носитель в отдельности дважды в день в течение 28 дней через желудочный зонд. Клинические наблюдения внутри клетки проводили ежедневно. При прекращении исследования в день 28 мышей умерщвляли путем передозировки изофлурана с последующей цервикальной дислокацией, и кровь собирали посредством пункции левого желудочка.

[00305] Для анализов антиоксидантной способности использовали набор для анализа общей антиоксидантной способности (ТАС) (Cell Biolabs, № по

каталогу: STA360), набор для анализа каталазной активности (Cell Biolabs, № по каталогу: STA341) и набор для анализа супероксиддисмутазной активности (Cell Biolabs, № по каталогу: STA341) в соответствии с протоколами производителя. Соединение 2A (1 мкМ) или DMSO добавляли к стандартным концентрациям мочевой кислоты, стандарту супероксиддисмутазы или каталазы в формате 96-луночного титрационного микропланшета. Образцы и стандарты разбавляли надлежащим реакционным реагентом и после добавления меди, пероксида водорода или раствора ксантина/раствора ксантинооксидазы подвергали реакции в течение 5 мин или 1 часа в соответствии с инструкциями производителя. Реагирующие вещества останавливали и анализировали с применением 96-луночного спектрофотометрического микропланшет-ридера при 490 нм или 520 нм.

[00306] Статистические данные

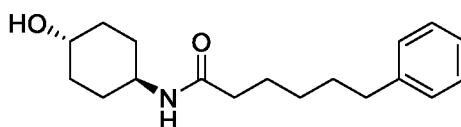
[00307] Если не указано иное, данные приведены в виде средних значений \pm SEM. Для сравнений двух групп использовали t-критерий Стьюдента; для сравнений нескольких групп использовали однофакторный ANOVA; для сравнений динамики по группам обработки или генотипа по группам обработки использовали двухфакторный ANOVA с апостериорным критерием Тьюки для индивидуальных статистических сравнений. Результаты при $p < 0,05$ считали значимыми. Подробная информация о статистических методах, точных значениях n и том, что n представляет собой, указана на фигурах и в условных обозначениях к фигурам.

[00308] Обработка мышей была рандомизирована в соответствии с таблицей случайных целых чисел (четных или нечетных) и проводилась исследователями, работающими в слепом режиме относительно статуса обработки. Анализ тканей после прекращения исследования проводили в слепом режиме.

Пример 1. Синтез иллюстративных соединений

Соединение 1

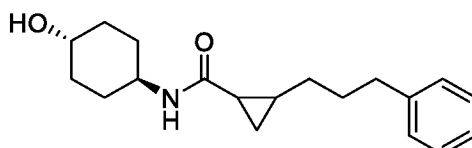
[00309] Синтез N-(*транс*-4-гидроксициклогексил)-5-фенилпентанамида (соединения 1). Данный активатор митофузина получали согласно описанному в публикации заявки на патент США 2020/0345668, которая включена в данный документ посредством ссылки.



Соединение 1

Соединение 2

[00310] Синтез N-(*транс*-4-гидроксициклогексил)-2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксамида (соединения 2).



Соединение 2

[00311] На схеме 1 ниже описан синтез N-((1*р*,4*р*)-4-гидроксициклогексил)-2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксамида (соединения 2) в рацемической форме.

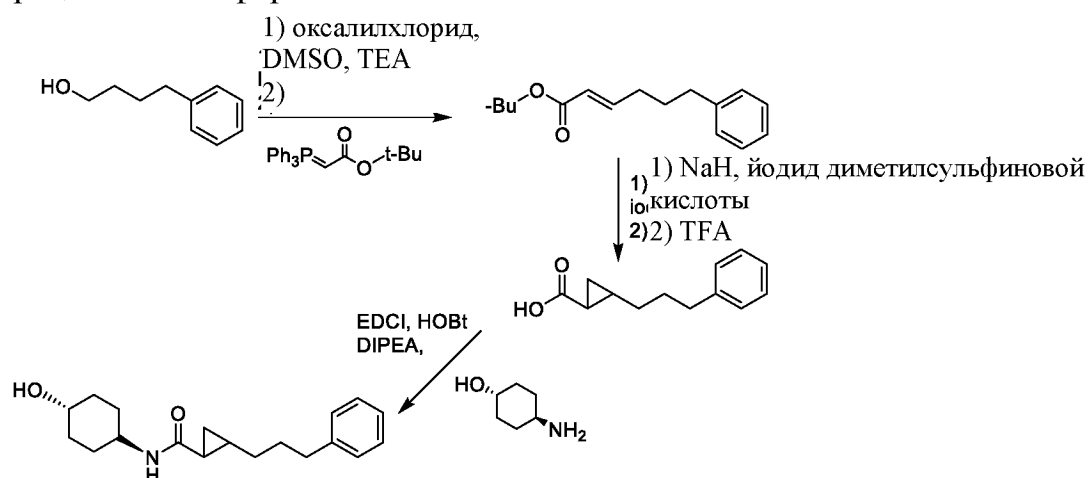


Схема 1

[00312] К раствору оксалилхлорида (4,65 г, 36,6 ммоль, 3,20 мл, 1,10 экв.) в DCM (75,0 мл), охлажденному до -55°C в атмосфере N_2 , по каплям добавляли раствор DMSO (5,72 г, 73,2 ммоль, 5,72 мл, 2,20 экв.) в DCM (30,0 мл). После перемешивания в течение 5 мин по каплям добавляли 4-фенилбутан-1-ол (5,00 г, 33,2 ммоль, 5,08 мл, 1,00 экв.) в DCM (15,0 мл). После перемешивания в течение 15 мин добавляли TEA (16,8 г, 166 ммоль, 23,1 мл, 5,00 экв.), и реакционную смесь нагревали до 25°C . Затем к нагретой реакционной смеси добавляли 100 мл 1 н. HCl, и продукт экстрагировали с помощью 200 мл DCM (100

мл х 2). Объединенные органические слои промывали с помощью 50 мл воды, высушивали над Na_2SO_4 , фильтровали и концентрировали с получением 4-фенилбутанала (5,00 г).

[00313] К раствору 4-фенилбутанала (5,00 г, 33,7 ммоль, 9,80 мл, 1,00 экв) в THF (50,0 мл) добавляли *трет*-бутил-2-(трифенил- λ 5-фосфанилиден)ацетат (16,5 г, 43,8 ммоль, 1,30 экв.). Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 12 ч. с получением *трет*-бутил-(*E*)-6-фенилгекс-2-еноата (6,00 г, 24,3 ммоль, выход 72,1%).

[00314] К суспензии NaH (1,17 г, 29,2 ммоль, чистота 60,0%, 1,20 экв.) в DMSO (30,0 мл) добавляли йодид диметилметансульфиновой кислоты (6,43 г, 29,2 ммоль, 1,20 экв.). Смесь перемешивали при 20°C в течение 0,5 ч., и добавляли *трет*-бутил-(*E*)-6-фенилгекс-2-еноат (6,00 г, 24,3 ммоль, 1,00 экв.) в DMSO (3,00 мл). Реакционную смесь перемешивали при 20°C в течение 1 ч. с получением *трет*-бутил-2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксилата (2,10 г, 8,07 ммоль, выход 33,1%). Удаление трет-бутилового сложного эфира осуществляли путем добавления TFA TFA (7,70 г, 67,5 ммоль, 5,00 мл, 17,5 экв.) к раствору *трет*-бутил-2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксилата (1,00 г, 3,84 ммоль, 1,00 экв.) в DCM (5,00 мл). После перемешивания при 25°C в течение 15 ч. получали 2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоновую кислоту (800 мг).

[00315] EDCI (1,00 г, 5,22 ммоль, 1,50 экв.), HOBT (564 мг, 4,18 ммоль, 1,20 экв.), DIPEA (1,35 г, 10,4 ммоль, 1,82 мл, 3,00 экв.) и транс-4-аминоциклогексан-1-ол (580 мг, 3,83 ммоль, 1,10 экв., HCl) добавляли к раствору 2-(3-фенилпропил)циклопропан-1-карбоксилата (800 мг, 3,48 ммоль, 1,00 экв) в DMF (8,00 мл) и перемешивали при 25°C в течение 16 ч. После удаления растворителя остаток очищали с помощью препаративной HPLC (колонка: Waters XBridge C18, 150*50 мм*10 мкм; подвижная фаза: [вода (10 mM NH_4HCO_3)-ACN]; B%: 28%-58%, 11,5 мин) с получением титульного соединения в виде белого твердого вещества. LC-MS: $R_t = 0,904$ мин, масса/заряд = 302,1 (M+H)⁺. HPLC: $R_t = 2,898$ мин, чистота: 98,6%, при 220 нм. ¹³C-ЯМР: (400 МГц, MeOD) δ 173,97, 142,27, 127,96, 127,89, 125,31, 69,07, 35,14, 33,45, 32,23, 30,87, 30,24, 21,27, 20,55, 13,04. ¹H-ЯМР: (400 МГц, MeOD) δ 7,27-7,24 (m, 2H), 7,18-7,15 (m, 3H), 3,64-3,61 (m, 1H), 3,55-3,50 (m,

1H), 2,64 (t, $J = 8$ Гц, 2H), 1,97-1,89 (m, 4H), 1,75-1,73 (m, 2H), 1,36-1,04 (m, 8H), 1,29-1,27 (m, 1H), 0,59-0,57 (m, 1H).

[00316] **Хиральное разделение соединений 2A и 2B.** Систему для препаративной SFC Thar 200 (SFC-7) использовали для разделения соединений 2A и 2B с применением колонки ChiralPak IG (I.D. 300 x 50 мм, 10 мкм) и следующих условий подвижной фазы: А для CO₂ и В для метанола (0,1% NH₃H₂O); градиент: 35% В; скорость потока: 200 мл/мин; обратное давление: 100 бар; температура колонки: 38°C; длина волны: 220 нм; и время цикла: ~ 4 мин. Соединение 2 растворяли в ~ 200 мл метанола, и использовали объемы введения 10 мл. После разделения растворитель удаляли *in vacuo* при температуре бани 40°C с получением каждого стереоизомера. Соединение 2B элюировалось быстрее, чем соединение 2A. На фиг. 1 показана иллюстративная хроматограмма HPLC хирального разделения соединений 2A и 2B. Стереохимическую транс-конфигурацию циклопропанового кольца устанавливали на основе известных стереохимических особенностей реакции циклопропанирования и константы связывания протонов циклопропанового кольца, составляющей 19 Гц. Абсолютную стереохимическую конфигурацию каждого стереоизомера устанавливали с помощью рентгеноструктурной кристаллографии, как дополнительно обсуждается ниже.

Соединение 4

[00317] Синтез (1R,2R)-2-((бензилтио)метил)-N-((1r,4R)-4-гидроксициклогексил)циклопропан-1-карбоксамид (соединения 4) и его хиральное разделение (соединения 4A и 4B). Титульное соединение синтезировали аналогично соединению 2, за исключением того, что исходный материал представлял собой фенилметантиол, который подвергали реакции с 2-хлор-1,1-диметоксиэтаном (1,2 экв.) в этаноле в присутствии этоксида натрия (1,0 экв.) и KI (0,05 экв.). Полученный бензил(2,2-диметоксиэтил)сульфан перемешивали при 60°C в течение 12 часов в H₂SO₄ с получением 2-(бензилтио)ацетальдегида. Затем 2-(бензилтио)ацетальдегид дополнительно преобразовывали согласно серии реакций, аналогичных показанным на схеме 1. Титульное соединение очищали в виде рацемической смеси с помощью препаративной HPLC с применением колонки Phenomenex Luna C18 (250 мм*50 мм, 10 мкм; подвижная фаза: [вода

(0,1% TFA)-ACN]; В%: 20%-50%, 20 мин.) и затем очищали с помощью препаративной SFC (колонка: DAICEL CHIRALPAK AD-H (250 мм*30 мм, 5 мкм); подвижная фаза: [0,1% NH₃H₂O-ЕТОН]; В%: 35%-35%, 2,7 мин; 240 мин). Продукт очищали с помощью (колонка: Phenomenex Gemini-NX C18, 75*30 мм*3 мкм; подвижная фаза: [вода (0,05% об./об. гидроксид аммония)-ACN]; В%: 15%-45%, 7 мин) и (колонка: Phenomenex Gemini-NX C18, 75*30 мм*3 мкм; подвижная фаза: [вода (0,225%FA)-ACN]; В%: 30%-60%, 2 мин). (R,R)- и (S,S)-стереоизомеры соединения 4 получали в виде отдельных пиков.

[00318] Соединение 4А имело чистоту 98,4% по данным HPLC и демонстрировало соотношение масса/заряд = 320,2 (M+H)⁺ по данным LCMS. Соединение 4В имело чистоту 97,3% по данным HPLC и демонстрировало соотношение масса/заряд = 319,9 (M+H)⁺ по данным LCMS. ¹H-ЯМР: (соединение 4А) (400 МГц, MeOD) δ 7,33-7,21 (m, 5H), 3,76 (s, 2H), 3,60-3,57 (m, 1H), 3,52–3,50 (m, 1H), 2,44-2,40 (m, 2H), 1,94-1,89 (m, 4H), 1,42-1,40 (m, 2H), 1,33-1,29 (m, 4H), 1,08 (td, *J* = 4,4, 8,8 Гц, 1H), 0,69 (ddd, *J* = 4,2, 6,0, 8,4 Гц, 1H); ¹H-ЯМР: (соединение 4В) (400 МГц, MeOD) δ 7,32-7,28 (m, 5H), 3,76 (s, 2H), 3,61-3,58 (m, 1H), 3,52-3,50 (m, 1H), 2,44-2,40 (m, 2H), 1,94-1,89 (m, 4H), 1,43-1,41 (m, 2H), 1,33-1,28 (m, 4H), 1,08 (td, *J* = 4,4, 8,8 Гц, 1H), 0,69 (ddd, *J* = 4,2, 6,0, 8,4 Гц, 1H).

Пример 2. Активность в отношении митофузина и фармакокинетические параметры иллюстративных соединений

[00319] В таблице 1А ниже обобщены данные о биологической активности и фармакокинетических параметрах соединения 2 по сравнению с соединением 1.

Таблица 1А

	Соединение 2	Соединение 1	Соединение 7
EC ₅₀ (нМ), MFN2	5,1	5,8	5,6
Связывание с белками плазмы крови	% связанного	% связанного	% связанного
у человека	94,4	91	89,1
у мыши	95,5	96,3	93,1
Микросомы печени	T _{1/2} (мин)	T _{1/2} (мин)	T _{1/2} (мин)
у человека	> 145	> 145	> 145
у мыши	114,1	92,4	76,7
Анализ РАМРА	нм/с	нм/с	нм/с

	58,451		26,277		39,0
Фармакокинетические параметры	IV	PO	IV	PO	
Доза (мг/кг)	10	50	10	50	
C ₀ /C _{max} (нг/мл)	32111	9900	50000	24000	
T _{max} (ч.)		0,5		0,5	
T _{1/2} (ч.)	1,64	3,02	1,1	2,2	
AUC (нг*ч./мл)	9178	26163	11657	44025	
Vdss (л/кг)	0,6		0,347		
Биодоступность, %		59		75,5	

[00320] Подробности тестирования активности в отношении MFN и анализе РАМРА приведены в заявках на патенты США 2020/034566 и 2020/0345669, включенных в данный документ посредством ссылки. Соединение 2, соединение 7 и соединение 1 демонстрировали сходные значения EC₅₀ в отношении активации митофузина. Анализ РАМРА соединения 2 неожиданно продемонстрировал более чем в два раза большее значение, чем для соединения 1, что характерно для большей пассивной проницаемости гематоэнцефалического барьера. Кроме того, соединение 2 демонстрировало более длительный период полувыведения из плазмы крови при введении IV или PO и большее распределение в тканях (Vdss).

[00321] Проводили биологическое тестирование разделенных стереоизомеров соединения 2. Сравнительные формы активности стимуляции митофузина у соединений 2А и 2В анализировали по статусу удлинения и поляризации митохондрий после 48-часового воздействия на нулевые по MFN1 (*m. e.* экспрессирующие только Mfn2, MFN1 KO) или нулевые по MFN2 (*m. e.* экспрессирующие только MFN1, MFN2 KO) мышинные эмбриональные фибробласты (MEF). На фиг. 2А и 2В показаны иллюстративные кривые дозозависимого эффекта для соединений 2А и 2В в сравнении с соединением 6 в отношении активности против MEF с нокаутом MFN1 и MEF с нокаутом MFN2. Как показано, соединение 2А демонстрировало высокую активность, сравнимую с активностью соединения 6, в обоих анализах. Соединение 2В, в отличие от этого, не смогло достичь даже 50% ответа (EC₅₀ > 10 мкМ). На фиг. 3А и 3В показаны соответствующие иллюстративные графики соотношения размеров митохондрий, полученного в присутствии соединений 2А и 2В, в сравнении с соединением 6 и

DMSO в качестве среды-носителя. В этом случае также только соединение 2А было высокоактивным в данном анализе.

[00322] Также определяли кривые дозозависимого эффекта для соединений 4А и 4В. Хотя EC_{50} соединения 4В в случае сульфида поддавалась измерению, активность соединения 4А была по-прежнему значительно выше. На фиг. 4 показаны кривые дозозависимого эффекта для соединений 4А и 4В в сравнении с соединением 1 в отношении активности против MEF с нокаутом MFN2.

[00323] Таким образом, стереоизомер, элюирующийся медленнее, был более активным соединением в случае как соединения 2А, так и его сульфидного аналога (соединения 4А). Соответственно, абсолютную стереохимическую конфигурацию соединения 2А и соединения 4А назначали по аналогии друг другу, как объясняется дополнительно ниже.

[00324] С учетом того, что соединение 2А представляло собой активный стереоизомер соединения 2, для данного соединения проводили более подробное фармакокинетическое исследование в плазме крови и ткани головного мозга. В таблице 2А обобщены фармакокинетические данные. Уровни соединения 2А одновременно измеряли в плазме крови и ткани головного мозга с возрастающими временными интервалами после однократной пероральной дозы 50 мг/кг. Фармакокинетические параметры в плазме крови после перорального введения были сходными с фармакокинетическими параметрами соединения 2 (смеси стереоизомеров), предоставляемого в идентичной дозе и идентичным путем в той же среде-носителе (10% DMSO, 90% [30% циклодекстрина]): t_{max} для обоих составляло 0,5 ч., $t_{1/2}$ составляло 2,83 ч. и 3,02 ч. соответственно, и среднее время пребывания в ткани (MRT) составляло 3,96 ч. и 3,58 ч. соответственно.

Таблица 2А

Соединение	Ткань	Путь введения дозы	Фактическая средняя доза (мг/кг)	$T_{1/2}$ (ч.)	T_{max} (ч.)	C_{max} (нг/мл)	AUC_{last} (ч.*нг/мл)	MRT_{inf} (ч.)
Соединение 2А	Плазма	РО	50	2,83	0,50	12100	34000	3,96

	крови							
	Головной мозг	PO	50	3,13	0,50	4030	13400	4,30
	Левый седалищный нерв	PO	50	3,21	0,50	4570	15300	4,62
	Правый седалищный нерв	PO	50	2,61	0,50	5370	13800	3,35

[00325] Уровни соединения 2А измеряли в плазме крови и тканях головного мозга с возрастающими временными интервалами после однократной пероральной дозы 50 мг/кг. Как приведено в таблице 2А, C_{max} , AUC, $t_{1/2}$ и среднее время пребывания (MRT) соединения 2А были сходными во всех трех неврологических тканях. Соответственно, приведенные выше результаты позволили предположить, что соединение 2А может демонстрировать благоприятные фармакодинамические параметры в нервной системе.

[00326] В таблице 2В ниже обобщены фармакокинетические параметры соединения 1 в плазме крови и головном мозге по сравнению с соединением 2А у мышей натошак^а.

Таблица 2В

	<u>Соединение 1</u>		<u>Соединение 2А</u>	
	Общее в плазме крови	Свободное в плазме крови	Общее в плазме крови	Свободное в плазме крови
C_{max} (нг/мл)	39011	1428	33619	1523
$t_{1/2}$ (ч)	1,280		1,67	
AUC _{0-last} (нг·ч./мл)	30612	1121	59567	2697
MRT _{0-last} (ч.)	1,01		1,92	
	Общее в головном мозге		Общее в головном мозге	
	Свободное в головном мозге	Свободное в головном мозге	Свободное в головном мозге	Свободное в головном мозге
C_{max} (нг/г)	10001	970	13480	774
$t_{1/2}$ (ч.)	0,999		1,77	
AUC _{0-last} (нг·ч./г)	7392	717	23465	1347
MRT _{0-last} (ч.)	0,959		1,98	

^aКонцентрации свободного соединения рассчитывали на основании анализов связывания с белками: соединение 1 — в плазме крови мыши 96,7%, в головном мозге мыши 90,3%; соединение 2 — в плазме крови мыши 95,5%, в головном мозге мыши 94,3%.

[00327] Проводили параллельное сравнение фармакокинетических параметров соединения 1 и соединения 2A в плазме крови и головном мозге. Для этих сравнительных исследований два соединения вводили в одной и той же дозе (50 мг/кг) и тем же путем (желудочный зонд) и с применением той же среды-носителя (5 мг/мл в 30% SBE-bCD). Как показано в таблице 3, соединение 2A продемонстрировало большую биодоступность в головном мозге (AUC общего и свободного) и более длительные $t_{1/2}$ и MRT в плазме крови и головном мозге.

Пример 3. Активация митофузина приводит к ослаблению дегенерации нейронов и мышц у мышей SOD1-G93A

[00328] Количество мышей, оцененных в каждой группе, указано в основании столбцов на графиках (т. е. фиг. 10-13).

Устойчивая активация митофузина приводила к обращению вспять митохондриальных аномалий, вызванных SOD1 G93A.

[00329] Чтобы понять механизмы, лежащие в основе защитных эффектов активации митофузина, ткани мышечной SOD1-G93A с ALS оценивали в отношении характерных фенотипов митохондрий, нейронов и скелетных миоцитов. Соединение 2A увеличивало количество митохондрий (фиг. 10A), улучшало фрагментацию митохондрий (фиг. 10B) и ослабляло аномалии митохондриальных крист (фиг. 10B) в аксонах седалищного нерва при ALS, исследованных в возрасте 140 дней. Более того, уровень митохондриальных ROS в аксонах седалищного нерва мышечной с ALS, который увеличивался вследствие мутации SOD1 G93A при ALS, уменьшался у мышечной, обработанной соединением 2A (фиг. 10C).

Устойчивая активация митофузина приводила к ослаблению дегенерации нейронов, вызванной SOD1 G93A.

[00330] Установлено, что уменьшение повреждения митохондрий коррелировало с нейромышечной защитой у мышей с ALS, обработанных соединением 2A. Аксоны седалищных нервов при ALS демонстрировали менее тяжелую атрофию (т. е. больший диаметр аксона) и меньшее количество миелиновых плотных телец при обработке соединением 2A (фиг. 11A, 11B). Активация митофузина также приводила к снижению распространенности апоптозных (TUNEL-положительных) нейронов в вентральных рогах спинного мозга мышей с ALS (фиг. 11C).

Устойчивая активация митофузина приводила к улучшению нейромышечной связи и уменьшению нейрогенной мышечной атрофии у мышей SOD1G93A.

[00331] Нахождение митохондрий в нейромышечных синапсах икроножных мышц (которые иннервируются пораженными седалищными нервами) угнеталось при ALS, что было ассоциировано с атрофией миоцитов и дегенеративным центральным расположением ядер мышечных волокон. Каждая из этих аномалий улучшалась в результате обработки соединением 2A (фиг. 12A-B). Как и в нейрональной ткани, активация митофузина подавляла повреждение белков, индуцированное ROS (фиг. 12C), что в икроножных мышцах было связано с улучшением окислительной способности мышц (окрашивание SDH; фиг. 12D).

Пример 4. Активация митофузина приводит к снижению нейрональной митотоксичности и способствует росту нейронов в культивируемых нейронах при ALS

Нейропротекторные механизмы *in vitro*, вызываемые активацией митофузина при SOD1-ALS.

[00332] В контексте установленных патофизиологических особенностей при ALS с мутацией SOD1 в настоящем изобретении предполагается три возможных механизма модулирования заболевания, обеспечиваемых активацией митофузина:

1. Меньшая митотоксичность обеспечивает уменьшение гибели нейронов (нейропротекторный эффект);
2. Улучшенный транспорт митохондрий к концам нейронов обеспечивает улучшение восстановления нейронов и нейромышечной связи (нейрорегенеративный эффект); и
3. Улучшение приспособленности митохондрий обеспечивает обращение вспять дыхательной дисфункции митохондрий, связанной с ALS (метаболический эффект).

[00333] Каждую из этих возможностей исследовали в культивируемых нейронах при ALS.

[00334] Эффекты активации митофузина в отношении митотоксичности (выработки ROS) и ассоциированной с ней гибели нейронов исследовали на DRG от мышей SOD1-G93A. Эффекты Chimera (являющегося прототипом низкомолекулярного активатора митофузина) и соединения 2A оценивали параллельно. Каждый из этих структурно различающихся активаторов митофузина подавлял выработку ROS в митохондриях (фиг. 13A) и уменьшал апоптотическую (фиг. 13B) и некротическую (фиг. 13C) гибель клеток, имеющую митохондриальный генез при данном заболевании. Оба активатора митофузина также стимулировали разрастание нейронов, способствуя локализации митохондрий на концевых ростовых зачатках (фиг. 13D и 13E). ALS может демонстрировать характерные метаболические аномалии, которые авторы настоящего изобретения также наблюдали в анализах Seahorse (фиг. 13F). Активация митофузина не приводила к улучшению метаболизма митохондрий в нейронах при ALS, измеряемого как потребление кислорода, связанное с выработкой ATP (фиг. 13F, вставка), либо максимальное потребление кислорода (фиг. 13F и не показано). Таким образом, активация митофузина приводит к ослаблению доклинической модели ALS благодаря комбинации нейропротекторных и нейрорегенеративных эффектов.

Пример 5. Определение характеристик соединений 4A и 4B

[00335] Определение характеристик соединений 4A и 4B с помощью рентгеновской порошковой дифракции, выращивания кристаллов и

рентгеноструктурной кристаллографии монокристаллов. Кристаллографически определяли характеристики соединений 4А и 4В в качестве имитаторов, чтобы установить абсолютную стереохимическую конфигурацию соединений 2А и 2В соответственно. В частности, в состав таких соединений включали тяжелый атом серы для облегчения рентгеноструктурных кристаллографических исследований монокристаллов.

[00336] Рентгеновская порошковая дифракция. Полученные соединения 4А и 4В демонстрировали микрокристаллическую морфологию при анализе с помощью рентгеновской порошковой дифракции. Рентгеновские порошковые дифрактограммы получали на системе PANalytical X'Pert Powder на держателе образцов с нулевым фоном из Si. Положение 2θ рассчитывали относительно эталонного стандартного диска из Si PANalytical. Другие экспериментальные параметры представлены в таблице 3 ниже.

Таблица 3

Параметры	Режим отражения	Режим отражения	Режим отражения
Длина волны рентгеновских лучей	Cu, ka	Cu, ka	Cu, ka
	Ka1 (Å): 1,540598, Ka2 (Å): 1,544426, Соотношение интенсивности Ka2/Ka1 : 0,50	Ka1 (Å): 1,540598, Ka2 (Å): 1,544426, Соотношение интенсивности Ka2/Ka1 : 0,50	Ka1 (Å): 1,540598, Ka2 (Å): 1,544426, Соотношение интенсивности Ka2/Ka1 : 0,50
Настройки рентгеновской трубки	45 кВ, 40 мА	45 кВ, 40 мА	45 кВ, 40 мА
Щель расходимости	Фиксированная $1/8^\circ$	Фиксированная $1/8^\circ$	Фиксированная $1/8^\circ$
Режим сканирования	Непрерывный	Непрерывный	Непрерывный
Диапазон сканирования ($^\circ 2\theta$)	3-40	3-40	3-40
Продолжительность шага сканирования [с]	18,87	97,665	197,115
Размер шага ($^\circ 2\theta$)	0,0131	0,0263	0,0263
Время тестирования	4 мин 15 с	10 мин 15 с	20 мин 15 с

[00337] Фиг. 5 представляет собой иллюстративную рентгеновскую порошковую дифрактограмму для соединений 4А и 4В. Как показано, рентгеновские порошковые дифрактограммы обеих стереоизомерных форм были по сути идентичными. Преобладающие пики наблюдали при следующих примерных значениях 2θ : 5,41 (m), 8,48 (w), 10,42 (m), 10,79 (m), 12,10 (m), 16,20 (w), 16,49 (w), 16,99 (w), 18,33 (m), 18,96 (s), 19,72 (w), 20,64 (m), 20,96 (m), 21,64 (w), 22,13 (m), 23,45 (w), 24,68 (w), 24,87 (w), 25,34 (w), 26,10 (w), 33,27 (w) и 38,23 (w) (w = слабый; m = средний; s = сильный).

[00338] **Выращивание кристаллов.** Эксперименты по выращиванию кристаллов соединений 4А и 4В предпринимали в разнообразных условиях, включающих медленное выпаривание, послойную диффузию и медленное охлаждение. Для экспериментов по медленному выпариванию насыщенные растворы соединений 4А и 4В помещали во флаконы для HPLC с перфорированными крышками. Обеспечивали прохождение роста кристаллов при комнатной температуре. С образцами, не дающими кристаллы в таких условиях, предпринимали эксперименты в условиях медленного охлаждения. Медленное охлаждение проводили путем суспендирования образца при 35-60°C в указанном растворителе, фильтрования через мембрану из PTFE с размером пор 0,2 мм и охлаждения раствора до 5°C при скорости линейного изменения 0,1°C/мин. В таблицах 4 и 5 обобщены результаты кристаллизации путем медленного выпаривания и медленного охлаждения соответственно. Образцы, обозначенные звездочкой в таблице 4, давали кристаллы до того, как можно было провести медленное охлаждение.

Таблица 4

ID эксперимента	Растворитель (об.:об.)	Результаты
Соединение 4В-1	MeOH	Кристаллы
Соединение 4В-2	EtOH	Прозрачный*
Соединение 4В-3	IPA	Переходили к медленному охлаждению
Соединение 4В-4	THF	Переходили к медленному охлаждению
Соединение 4В-5	CH ₃ Cl	Переходили к медленному охлаждению
Соединение 4В-6	DCM	Переходили к медленному охлаждению

ID эксперимента	Растворитель (об.:об.)	Результаты
Соединение 4В-7	Диоксан	Кристаллы
Соединение 4В-8	АСN	Кристаллы
Соединение 4В-9	2-МеТНF	Переходили к медленному охлаждению
Соединение 4В-10	Ацетон	Кристаллы
Соединение 4А-1	МеОН	Прозрачный*
Соединение 4А-2	ЕtОН	Прозрачный*
Соединение 4А-3	IPA	Переходили к медленному охлаждению
Соединение 4А-4	ТНF	Переходили к медленному охлаждению
Соединение 4А-5	СН ₃ Сl	Переходили к медленному охлаждению
Соединение 4А-6	DCM	Переходили к медленному охлаждению
Соединение 4А-7	АСN	Переходили к медленному охлаждению
Соединение 4А-8	МЕК	Переходили к медленному охлаждению
Соединение 4А-9	МlВК	Переходили к медленному охлаждению
Соединение 4А-10	ЕtОAc	Кристаллы

Таблица 5

ID эксперимента	Растворитель (об.:об.)	Температура нагревания	Результаты
Соединение 4В-4	ТНF	60°C	Прозрачный
Соединение 4В-5	СН ₃ Сl	60°C	Кристаллы
Соединение 4В-6	DCM	35°C	Прозрачный
Соединение 4В-7	Диоксан	60°C	Кристаллы
Соединение 4В-8	АСN	60°C	Кристаллы
Соединение 4В-9	2-МеТНF	60°C	Кристаллы
Соединение 4В-10	Ацетон	50°C	Кристаллы
Соединение 4А-3	IPA	60°C	Прозрачный
Соединение 4А-4	ТНF	60°C	Прозрачный
Соединение 4А-5	СН ₃ Сl	60°C	Прозрачный
Соединение 4А-6	DCM	35°C	Прозрачный
Соединение 4А-7	АСN	60°C	Кристаллы
Соединение 4А-8	МЕК	60°C	Кристаллы
Соединение 4А-9	МlВК	60°C	Кристаллы
Соединение 4А-10	ЕtОAc	60°C	Кристаллы

Эксперименты по кристаллизации методом послыной диффузии проводили путем помещения насыщенного раствора соединений 4А или 4В во флакон для

HPLC и осторожного нанесения слоев антирастворителя поверх насыщенного раствора. Затем флаконы оставляли при комнатной температуре для обеспечения возможности диффузии двух растворителей друг в друга. В таблице 6 обобщены эксперименты по кристаллизации методом послойной диффузии.

Таблица 6

ИД эксперимента	Растворитель	Антирастворитель	Результаты
Соединение 4В-1	DCM	MTBE	Кристаллы
Соединение 4В-2	DCM	н-Гептан	Прозрачный
Соединение 4В-3	DCM	Толуол	Прозрачный
Соединение 4В-4	DMSO	H ₂ O	Кристаллы
Соединение 4В-5	DMSO	MTBE	Прозрачный
Соединение 4В-6	DMSO	IPAc	Прозрачный
Соединение 4В-7	DMSO	Толуол	Прозрачный
Соединение 4В-8	THF	н-Гептан	Кристаллы
Соединение 4В-9	THF	MTBE	Прозрачный
Соединение 4В-10	EtOH	н-Гептан	Прозрачный
Соединение 4А-1	DCM	MTBE	Кристаллы
Соединение 4А-2	DCM	н-Гептан	Прозрачный
Соединение 4А-3	DCM	Толуол	Прозрачный
Соединение 4А-4	DMSO	H ₂ O	Кристаллы
Соединение 4А-5	DMSO	MTBE	Прозрачный
Соединение 4А-6	DMSO	IPAc	Прозрачный
Соединение 4А-7	DMSO	Толуол	Прозрачный
Соединение 4А-8	THF	н-Гептан	Прозрачный
Соединение 4А-9	THF	MTBE	Прозрачный
Соединение 4А-10	EtOH	н-Гептан	Прозрачный

[00339] Рентгеновская дифракция монокристаллов. Монокристаллы соединения 4А получали в виде стержней в результате медленного выпаривания в этилацетате (таблица 4, соединение 4А-10). Монокристаллы соединения 4В получали в виде иголок в результате медленного выпаривания в ацетонитриле (таблица 4, соединение 4В-8). На фиг. 6А и 6В показаны иллюстративные изображения кристаллов соединений 4А и 4В, полученные посредством микроскопии в поляризованном свете, соответственно.

[00340] Каждый образец устанавливали в майларовую MicroLoop™ от MiTeGen в произвольной ориентации и погружали в криомасло с низкой вязкостью (CryoOil™ LV5 от MiTeGen) и помещали в поток жидкого азота при температуре 173 К, контролируемый с помощью системы охлаждения Oxford 800 CryoStream.

[00341] Данные об интенсивности рентгеновского излучения измеряли на дифрактометре D8 VENTURE от Bruker (микрофокусный источник рентгеновского излучения I μ S, Cu-K α , $\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$, CMOS-детектор фотонов). Стратегию создавали и оптимизировали с помощью программного обеспечения Apex3 от Bruker, и кадры изображений интегрировали с помощью пакета программного обеспечения SAINT от Bruker. При интеграции данных с применением моноклинной элементарной ячейки получали в общей сложности 22379 отражений с максимальным углом θ $67,679^\circ$ (разрешающая способность $0,83 \text{ \AA}$), из которых 3511 были независимыми ($R_{\text{int}} = 6,73\%$, $R_{\text{sig}} = 3,92\%$) и превышали $2\sigma(F^2)$. Конечные константы ячейки $a = 10,556(9) \text{ \AA}$, $b = 4,991(2) \text{ \AA}$, $c = 16,855(13) \text{ \AA}$, $\alpha = \gamma = 90^\circ$, $\beta = 102,89(3)^\circ$, объем ячейки = $865,6(11) \text{ \AA}^3$ определены на основании уточнения XYZ-центроидов 3511 отражений выше $20 \sigma(I)$ при $2,689^\circ < \theta < 74,849^\circ$. В данные вносили поправку на эффекты поглощения с применением способа многократного сканирования (SADABS-2016/2). Коэффициент поглощения μ данного материала составляет $1,706 \text{ мм}^{-1}$ при данной длине волны ($1,54178 \text{ \AA}$). Расчетные минимальный и максимальный коэффициенты пропускания (на основе размера кристалла) составляли 0,7946 и 1,000. Коэффициент согласованности для усреднения на основе интенсивности составлял 3,69%.

[00342] В таблице 7 обобщены данные рентгеноструктурной кристаллографии монокристаллов соединения 4A. В таблицах 8-10 ниже приведены перечень атомных координат и другие кристаллографические данные для соединения 4A.

Таблица 7

Эмпирическая формула	C ₁₈ H ₂₅ NO ₂ S
Молекулярная масса по формуле соединения	319,45
Температура	173(2) К
Длина волны	1,54178 \AA
Кристаллическая система	Моноклинная
Пространственная группа	P2 ₁
Параметры элементарной ячейки	$a = 10,556(9) \text{ \AA}$ $\alpha = 90^\circ$
	$b = 4,991(2) \text{ \AA}$ $\beta = 102,89(3)^\circ$
	$c = 16,855(13) \text{ \AA}$ $\gamma = 90^\circ$
Объем	$865,6(11) \text{ \AA}^3$
Z	2

Плотность (расчетная)	1,226 Мг/м ³
Коэффициент поглощения	1,706 мм ⁻¹
F(000)	344
Размер кристалла	0,331 x 0,051 x 0,045 мм ³
Диапазон углов тета для сбора данных	От 2,689 до 74,849°.
Диапазоны индексов	-13<=h<=13, -6<=k<=5, -21<=l<=21
Собранные отражения	22379
Независимые отражения	3511 [R(int) = 0,0673]
Полнота до тета = 67,679°	100,0%
Поправка на поглощение	Полуэмпирическая из эквивалентов
Макс. и мин. пропускание	1,000 и 0,7946
Способ уточнения	Метод наименьших квадратов в полноматричном приближении по F2
Данные/ограничения/параметры	3511/1/199
Критерий согласия по F2	1,034
Конечные R-индексы [I > 2 сигма (I)]	R1 = 0,0369, wR ² = 0,0883
R-индексы (все данные)	R1 = 0,0451, wR ² = 0,0938
Параметр абсолютной структуры	0,056(12)
Коэффициент экстинкции	Данные отсутствуют
Наибольший разностный пик и дырка	0,164 и -0,256 е·Å ⁻³

Атомные координаты представлены в виде (x104), а параметры смещения в виде (Å2x 103). U(eq) определяется как одна треть следа ортогонализированного тензора U_{ij}.

Таблица 8

	x	y	z	U(eq)
O(1)	4920(3)	7546(4)	9653(1)	55(1)
C(2)	5106(3)	8206(6)	8860(2)	37(1)
C(3)	4688(3)	5828(6)	8309(2)	39(1)
C(4)	4934(3)	6338(6)	7461(2)	34(1)
C(5)	6344(3)	7057(5)	7502(2)	28(1)
C(6)	6744(3)	9472(5)	8049(2)	32(1)
C(7)	6504(3)	8958(6)	8895(2)	38(1)
N(8)	6594(2)	7605(4)	6701(1)	28(1)
C(9)	6770(3)	5650(5)	6192(2)	28(1)

O(10)	6762(2)	3256(4)	6373(1)	41(1)
C(11)	6973(3)	6534(6)	5389(2)	31(1)
C(12)	6291(3)	4898(7)	4663(2)	40(1)
C(13)	7722(3)	4670(6)	4952(2)	31(1)
C(14)	8592(3)	5792(6)	4441(2)	40(1)
S(15)	8556(1)	3480(2)	3604(1)	46(1)
C(16)	9615(4)	5159(9)	3058(2)	59(1)
C(17)	9477(3)	3854(8)	2237(2)	47(1)
C(18)	10234(3)	1699(8)	2127(2)	51(1)
C(19)	10132(4)	546(8)	1374(2)	58(1)
C(20)	9262(4)	1507(9)	716(2)	60(1)
C(21)	8474(4)	3603(11)	806(2)	66(1)
C(22)	8574(4)	4791(9)	1564(2)	59(1)

Длины связей [Å] и углы [°] для 6034423_03_V10-FF.

Таблица 9

O(1)-C(2)	1,432(3)
O(1)-H(1A)	0,8400
C(2)-C(7)	1,511(5)
C(2)-C(3)	1,511(4)
C(2)-H(2A)	1,0000
C(3)-C(4)	1,529(4)
C(3)-H(3A)	0,9900
C(3)-H(3B)	0,9900
C(4)-C(5)	1,517(4)
C(4)-H(4A)	0,9900
C(4)-H(4B)	0,9900
C(5)-N(8)	1,457(3)
C(5)-C(6)	1,519(4)
C(5)-H(5A)	1,0000
C(6)-C(7)	1,526(4)
C(6)-H(6A)	0,9900
C(6)-H(6B)	0,9900
C(7)-H(7A)	0,9900
C(7)-H(7B)	0,9900
N(8)-C(9)	1,339(3)
N(8)-H(8A)	0,8800
C(9)-O(10)	1,234(4)
C(9)-C(11)	1,484(4)
C(11)-C(12)	1,513(4)
C(11)-C(13)	1,515(4)
C(11)-H(11A)	1,0000
C(12)-C(13)	1,485(5)
C(12)-H(12A)	0,9900

C(12)-H(12B)	0,9900
C(13)-C(14)	1,500(4)
C(13)-H(13A)	1,0000
C(14)-S(15)	1,816(3)
C(14)-H(14A)	0,9900
C(14)-H(14B)	0,9900
S(15)-C(16)	1,805(4)
C(16)-C(17)	1,507(5)
C(16)-H(16A)	0,9900
C(16)-H(16B)	0,9900
C(17)-C(18)	1,377(5)
C(17)-C(22)	1,390(5)
C(18)-C(19)	1,376(5)
C(18)-H(18A)	0,9500
C(19)-C(20)	1,359(6)
C(19)-H(19A)	0,9500
C(20)-C(21)	1,365(7)
C(20)-H(20A)	0,9500
C(21)-C(22)	1,392(6)
C(21)-H(21A)	0,9500
C(22)-H(22A)	0,9500
C(2)-O(1)-H(1A)	109,5
O(1)-C(2)-C(7)	110,9(3)
O(1)-C(2)-C(3)	108,1(2)
C(7)-C(2)-C(3)	111,5(2)
O(1)-C(2)-H(2A)	108,7
C(7)-C(2)-H(2A)	108,7
C(3)-C(2)-H(2A)	108,7
C(2)-C(3)-C(4)	110,9(2)
C(2)-C(3)-H(3A)	109,5
C(4)-C(3)-H(3A)	109,5
C(2)-C(3)-H(3B)	109,5
C(4)-C(3)-H(3B)	109,5
H(3A)-C(3)-H(3B)	108,0
C(5)-C(4)-C(3)	111,5(3)
C(5)-C(4)-H(4A)	109,3
C(3)-C(4)-H(4A)	109,3
C(5)-C(4)-H(4B)	109,3
C(3)-C(4)-H(4B)	109,3
H(4A)-C(4)-H(4B)	108,0
N(8)-C(5)-C(4)	112,4(2)
N(8)-C(5)-C(6)	109,2(2)
C(4)-C(5)-C(6)	110,6(2)
N(8)-C(5)-H(5A)	108,1
C(4)-C(5)-H(5A)	108,1
C(6)-C(5)-H(5A)	108,1
C(5)-C(6)-C(7)	110,6(2)
C(5)-C(6)-H(6A)	109,5

C(7)-C(6)-H(6A)	109,5
C(5)-C(6)-H(6B)	109,5
C(7)-C(6)-H(6B)	109,5
H(6A)-C(6)-H(6B)	108,1
C(2)-C(7)-C(6)	111,7(2)
C(2)-C(7)-H(7A)	109,3
C(6)-C(7)-H(7A)	109,3
C(2)-C(7)-H(7B)	109,3
C(6)-C(7)-H(7B)	109,3
H(7A)-C(7)-H(7B)	107,9
C(9)-N(8)-C(5)	122,4(2)
C(9)-N(8)-H(8A)	118,8
C(5)-N(8)-H(8A)	118,8
O(10)-C(9)-N(8)	122,6(2)
O(10)-C(9)-C(11)	121,6(2)
N(8)-C(9)-C(11)	115,9(2)
C(9)-C(11)-C(12)	115,9(2)
C(9)-C(11)-C(13)	117,3(2)
C(12)-C(11)-C(13)	58,7(2)
C(9)-C(11)-H(11A)	117,3
C(12)-C(11)-H(11A)	117,3
C(13)-C(11)-H(11A)	117,3
C(13)-C(12)-C(11)	60,69(19)
C(13)-C(12)-H(12A)	117,7
C(11)-C(12)-H(12A)	117,7
C(13)-C(12)-H(12B)	117,7
C(11)-C(12)-H(12B)	117,7
H(12A)-C(12)-H(12B)	114,8
C(12)-C(13)-C(14)	119,4(3)
C(12)-C(13)-C(11)	60,6(2)
C(14)-C(13)-C(11)	120,2(3)
C(12)-C(13)-H(13A)	115,2
C(14)-C(13)-H(13A)	115,2
C(11)-C(13)-H(13A)	115,2
C(13)-C(14)-S(15)	107,4(2)
C(13)-C(14)-H(14A)	110,2
S(15)-C(14)-H(14A)	110,2
C(13)-C(14)-H(14B)	110,2
S(15)-C(14)-H(14B)	110,2
H(14A)-C(14)-H(14B)	108,5
C(16)-S(15)-C(14)	101,13(16)
C(17)-C(16)-S(15)	108,9(3)
C(17)-C(16)-H(16A)	109,9
S(15)-C(16)-H(16A)	109,9
C(17)-C(16)-H(16B)	109,9
S(15)-C(16)-H(16B)	109,9
H(16A)-C(16)-H(16B)	108,3
C(18)-C(17)-C(22)	117,8(3)

C(18)-C(17)-C(16)	121,4(4)
C(22)-C(17)-C(16)	120,8(4)
C(19)-C(18)-C(17)	121,5(4)
C(19)-C(18)-H(18A)	119,2
C(17)-C(18)-H(18A)	119,2
C(20)-C(19)-C(18)	120,3(4)
C(20)-C(19)-H(19A)	119,9
C(18)-C(19)-H(19A)	119,9
C(19)-C(20)-C(21)	119,9(4)
C(19)-C(20)-H(20A)	120,1
C(21)-C(20)-H(20A)	120,1
C(20)-C(21)-C(22)	120,3(4)
C(20)-C(21)-H(21A)	119,9
C(22)-C(21)-H(21A)	119,9
C(17)-C(22)-C(21)	120,3(4)
C(17)-C(22)-H(22A)	119,9
C(21)-C(22)-H(22A)	119,9

Параметры анизотропного смещения приведены в таблице 11 и указаны в виде $\text{Å}^2 \times 10^3$, и показатель степени множителя принимает вид: $-2\pi^2 [h^2 a^*2U11 + \dots + 2hk a^* b^* U12]$

Таблица 11

	U11	U22	U33	U23	U13	U12
O(1)	111(2)	26(1)	43(1)	1(1)	49(1)	-3(1)
C(2)	65(2)	20(1)	35(1)	4(1)	28(1)	2(1)
C(3)	58(2)	24(2)	43(2)	-1(1)	28(1)	-5(1)
C(4)	42(2)	28(1)	35(2)	-1(1)	14(1)	-3(1)
C(5)	42(2)	18(1)	25(1)	0(1)	12(1)	2(1)
C(6)	45(2)	21(1)	34(2)	-3(1)	17(1)	-2(1)
C(7)	58(2)	27(2)	29(1)	-2(1)	13(1)	4(1)
N(8)	45(1)	17(1)	25(1)	1(1)	13(1)	-1(1)
C(9)	38(1)	19(1)	28(1)	-1(1)	10(1)	-2(1)
O(10)	74(1)	19(1)	35(1)	2(1)	24(1)	-2(1)
C(11)	46(2)	21(1)	28(1)	0(1)	14(1)	-1(1)
C(12)	44(2)	48(2)	30(1)	-4(1)	12(1)	-5(1)
C(13)	42(2)	25(1)	30(1)	-1(1)	15(1)	0(1)
C(14)	48(2)	37(2)	38(2)	-2(1)	20(1)	-6(1)
S(15)	62(1)	41(1)	44(1)	-7(1)	29(1)	-10(1)
C(16)	64(2)	70(3)	53(2)	-16(2)	33(2)	-23(2)
C(17)	50(2)	58(2)	39(2)	-4(2)	22(1)	-15(2)
C(18)	44(2)	65(2)	47(2)	1(2)	11(2)	-9(2)

C(19) 53(2)	61(2)	63(2)	-14(2)	21(2)	-7(2)
C(20) 74(3)	66(3)	44(2)	-9(2)	21(2)	-14(2)
C(21) 76(3)	73(3)	45(2)	11(2)	4(2)	-7(2)
C(22) 64(2)	54(2)	62(2)	2(2)	20(2)	3(2)

[00343] Структуру расшифровывали с помощью программы для расшифровки структуры *ShelXT* с использованием внутреннего фазирования и уточняли с помощью пакета для уточнения *ShelXL* (версия 2014/7) с применением метода наименьших квадратов в полноматричном приближении по F^2 , содержащегося в пакете программного обеспечения SHELX, с использованием пространственной группы $P4_3$ с $Z = 2$ для формульной единицы $C_{18}H_{25}NO_2S$). Все атомы, отличные от водорода, уточняли анизотропно. Положения атомов водорода, соединенных с атомами углерода, представляли в геометрически идеализированном виде и уточняли с применением модели "наездника". Конечное анизотропное уточнение с применением метода наименьших квадратов в полноматричном приближении по F^2 со 199 переменными параметрами сходилась при $R_1 = 3,69\%$ для наблюдаемых данных и $wR_2 = 9,38\%$ для всех данных. Критерий согласия составлял 1,034. Наибольший пик в конечном разностном синтезе электронной плотности составлял $0,164 \text{ e}^-/\text{Å}^3$, и наибольшая дырка составляла $-0,256 \text{ e}^-/\text{Å}^3$. На основе конечной модели расчетная плотность составляет $1,226 \text{ г/см}^3$, а $F(000) = 1140 \text{ e}^-$. Параметр абсолютной структуры (коэффициент Флэка (x)), уточненный до значения $0,056(12)$, и параметр статистического анализа пар Бийво (коэффициент Хуфта (y)), уточненный до $0,058(10)$, указывают на то, что абсолютная стереохимическая конфигурация молекулы была определена со статистической значимостью. Это дополнительно подтверждалось уточнением с помощью TWIN/BASF, которое позволило сделать вывод об отсутствии энантиомерного двойничества.

[00344] На фиг. 7А и 7В показаны диаграммы ORTEP, на которых представлены рентгеновские кристаллографические структуры монокристаллов соединений 4А и 4В соответственно. Термические эллипсоиды показаны с 50% доверительным интервалом. Атомы водорода представлены в геометрически идеализированном виде. На фиг. 8 показана схема упаковки для соединения 4А.

[00345] Рентгеновская кристаллографическая структура соединения 4А не демонстрирует какого-либо вида кристаллографического беспорядка. Асимметричная элементарная ячейка содержит только одну молекулу. Молекулы растворителя отсутствуют, и, вероятно, поэтому такие кристаллы легко образуются из систем из нескольких растворителей с идентичной морфологией. Молекулы образуют псевдополимерную структуру, соединенную амидными компонентами вблизи центра молекулы. Атом кислорода карбонила (O10) формирует сильное взаимодействие с образованием водородных связей с атомом водорода, соединенным с атомом азота амида смежных молекул (N8). Длина водородной связи, измеренная по расстоянию между донором и акцептором, составляет 2,887 Å. Кроме того, данный контакт лишь слегка отклоняется от идеализированной геометрии водородной связи, как измерено по линейности, включая идеализированный H8A, по углу O10-N8, составляющему 171,31°. Второе из этих взаимодействий с образованием водородных связей представляет собой димеризацию этих псевдополимерных структур по концевому спирту (O1). Измеренное расстояние между донором и акцептором для данного контакта составляет 2,745 Å, что означает еще более сильное взаимодействие. Это может быть обусловлено тем, что каждый вовлеченный спирт является как донором, так и акцептором, дополнительно поляризуя каждый вовлеченный атом кислорода, особенно при образовании зигзагообразных структур с углом O-O-O, составляющим 130,72°, что способствует тригонально-планарному типу взаимодействия.

[00346] Углеродные связи по обе стороны от атома серы являются высокосимметричными (1,805, 1,817 Å), при этом угол связи C14-S15-C16 является острым и составляет 101,12°, что не является редкостью для взаимодействий в сераорганических соединениях. Связи внутри циклопропильного компонента слегка неравномерны, поскольку наиболее длинным взаимодействием является связь в остоле C11-C13 (1,515 Å), тогда как прилегающие связи являются асимметричными с более длинной связью альфа-атома углерода с электроположительным атомом углерода амида (C11-C12, 1,513 Å) по сравнению с бета-атомом углерода с электронодонорным атомом серы (C13-C12, 1,484 Å). Длина молекулы в целом при измерении по двум атомам водорода,

представленных в идеализированном виде на основании двух самых дальних атомов, составляет 18,415 Å.

[00347] Элементарная ячейка соединения 4A не содержит молекул сольватов, которые могут быть разделены кристаллографически, и содержит общее свободное пространство, доступное для растворителя, составляющее 0% ($0,0 \text{ \AA}^3$), как рассчитано с помощью зонда на $1,2 \text{ \AA}$. По оценкам, общее количество электронов в элементарной ячейке ($F000'$) составляет 345,54, тогда как общее количество электронов, учтенных в структуре ($F000$), составляет 344,0, оставляя примерно 1,54 электрона в показателе плотности в пиках Фурье, не отнесенных к существующим атомам, крайне недостаточных для отнесения к неидентифицированным молекулам растворителя.

[00348] Кристаллическая форма соединения 4A не изменилась при перекристаллизации. На фиг. 9 показаны данные рентгеновской порошковой дифракции для полученного микрокристаллического соединения 4A в сравнении с моделированными данными рентгеновской порошковой дифракции, полученными из данных рентгеновской кристаллографии монокристаллов соединения 4A. На основании сходства этих графиков было установлено, что кристаллическая форма не меняется.

ЭКВИВАЛЕНТЫ

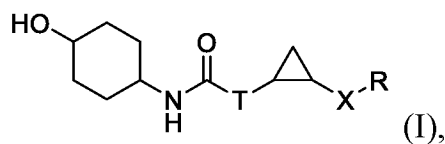
[00349] Подробности одного или более вариантов осуществления настоящего изобретения представлены в сопутствующем описании выше. Хотя любые способы и материалы, аналогичные или эквивалентные описанным в данном документе, могут применяться при реализации на практике или при тестировании настоящего изобретения, предпочтительные способы и материалы описаны здесь. Другие признаки, цели и преимущества настоящего изобретения станут очевидными из описания и из формулы изобретения. В настоящем описании и прилагаемой формуле изобретения формы единственного числа включают формы множественного числа, если из контекста явно не следует иное. Если не указано иное, все технические и научные термины, используемые в данном документе, имеют то же значение, которое обычно понимается специалистом средней квалификации в области техники, к которой относится настоящее

изобретение. Все патенты и публикации, цитируемые в настоящем описании, включены посредством ссылки.

[00350] Вышеуказанное описание было представлено только в целях иллюстрации и не предназначено для ограничения настоящего изобретения точной раскрытой формой, но лишь прилагаемой к данному документу формулой изобретения.

ФОРМУЛА ИЗОБРЕТЕНИЯ

1. Соединение формулы (I):



или его фармацевтически приемлемая соль, где

T отсутствует или представляет собой C₁-C₅алкилен или 2-5-членный гетероалкилен, где C₁-C₅алкилен или 1-5-членный гетероалкилен необязательно замещен одним или более R^T;

каждый R^T независимо представляет собой галоген, циано, -OR^{T1}, -N(R^{T1})₂, оксо, C₁-C₁₀алкил или C₃-C₁₀циклоалкил; или два R^T вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют C₃-C₁₀циклоалкил или 3-10-членный гетероциклоалкил;

каждый R^{T1} независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил;

X представляет собой C₂-C₅алкилен или 2-5-членный гетероалкилен, где C₂-C₅алкилен или 2-5-членный гетероалкилен необязательно замещен одним или более R^X;

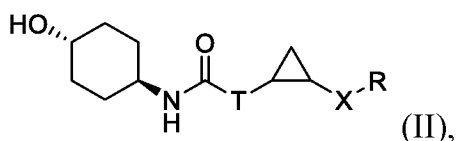
каждый R^X независимо представляет собой галоген, циано, -OR^{X1}, -N(R^{X1})₂, оксо, C₁-C₁₀алкил или C₃-C₁₀циклоалкил; или два R^X вместе с атомом, к которому они присоединены, образуют C₃-C₁₀циклоалкил или 3-10-членный гетероциклоалкил;

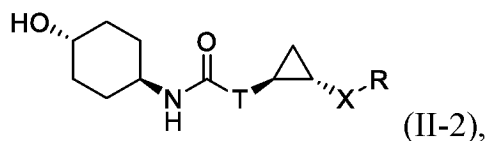
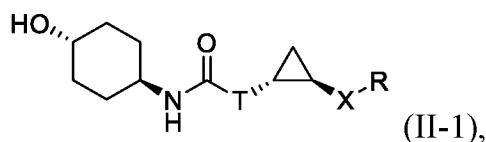
каждый R^{X1} независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил;

R представляет собой C₆-C₁₀арил или 5-10-членный гетероарил, где C₆-C₁₀арил или 5-10-членный гетероарил необязательно замещен одним или более из галогена, циано, -OR^S, -N(R^S)₂, C₁-C₁₀алкила или C₃-C₁₀циклоалкила; и

каждый R^S независимо представляет собой H или C₁-C₆алкил.

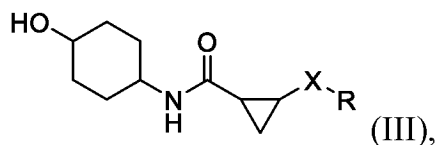
2. Соединение по п. 1, представленное формулой (II), (II-1) или (II-2):





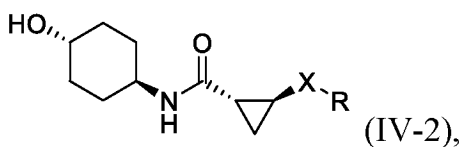
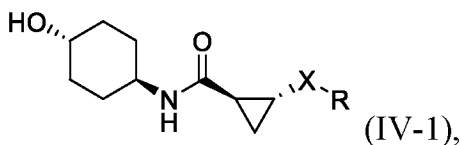
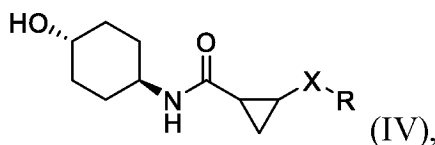
или его фармацевтически приемлемая соль.

3. Соединение по любому из предыдущих пунктов, представленное формулой (III):



или его фармацевтически приемлемая соль.

4. Соединение по любому из предыдущих пунктов, представленное формулой (IV), (IV-1) или (IV-2):



или его фармацевтически приемлемая соль.

5. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где Т отсутствует.

6. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где Т представляет собой C₁-C₅алкилен, необязательно замещенный одним или более R^T.

7. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где Т представляет собой C₁-C₅алкилен.

8. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где X представляет собой C₂-C₅алкилен, необязательно замещенный одним или более R^X.

9. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где X представляет собой C₂-C₅алкилен.

10. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где X представляет собой 2-5-членный гетероалкилен, необязательно замещенный одним или более из галогена, циано, -OR^X, -N(R^X)₂ или C₃-C₁₀циклоалкила.

11. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где X представляет собой -CH₂YCH₂-* или -CH₂CH₂Y-*, где:

* обозначает точку присоединения к R; и

Y представляет собой -O-, -S-, -S(=O)-, -S(=O)₂-, -C(R^X)₂- или -NR^X-.

12. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где X представляет собой -CH₂YCH₂-*, и Y представляет собой -O-, -S- или -CH₂-.

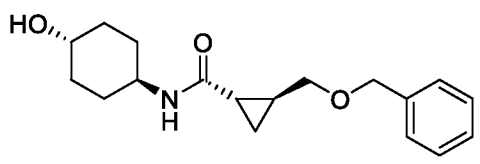
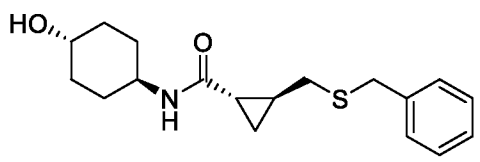
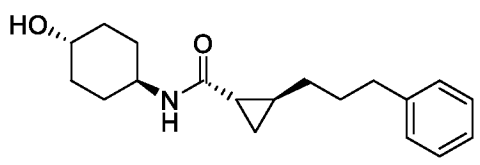
13. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где X представляет собой -(CH₂)₃-.

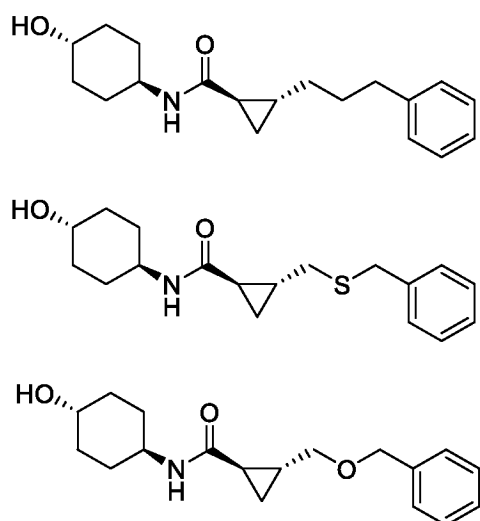
14. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R представляет собой C₆-C₁₀арил, необязательно замещенный одним или более из галогена, циано, -OR^S, -N(R^S)₂ или C₃-C₁₀циклоалкила.

15. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R представляет собой C₆-C₁₀арил.

16. Соединение по любому из предыдущих пунктов, где R представляет собой фенил.

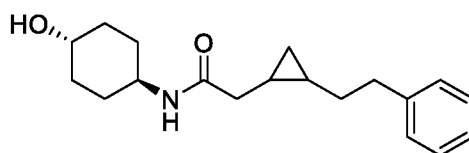
17. Соединение по любому из предыдущих пунктов, выбранное из:





или их фармацевтически приемлемых солей.

18. Соединение по любому из предыдущих пунктов, представляющее собой



или его фармацевтически приемлемую соль.

19. Фармацевтическая композиция, содержащая соединение по любому из предыдущих пунктов и фармацевтически приемлемое вспомогательное вещество.

20. Способ лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, нуждающегося в этом, включающий введение субъекту соединения или фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов.

21. Соединение или фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов для применения в лечении или предупреждении заболевания, нарушения или состояния у субъекта, нуждающегося в этом.

22. Применение соединения или фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов в изготовлении лекарственного препарата для лечения или предупреждения заболевания, нарушения или состояния у субъекта, нуждающегося в этом.

23. Способ, соединение, фармацевтическая композиция или применение по любому из предыдущих пунктов, где субъекту вводится терапевтически эффективное количество соединения или фармацевтической композиции.

24. Способ, соединение, фармацевтическая композиция или применение по любому из предыдущих пунктов, где заболевание, нарушение или состояние ассоциировано с митохондриями.

25. Способ, соединение, фармацевтическая композиция или применение по любому из предыдущих пунктов, где заболевание, нарушение или состояние представляет собой генетическое или негенетическое нарушение, физическое повреждение или химическое поражение периферической нервной системы (PNS), центральной нервной системы (CNS).

26. Способ, соединение, фармацевтическая композиция или применение по любому из предыдущих пунктов, где нарушение со стороны PNS или CNS представляет собой одно или более состояний, выбранных из группы, состоящей из хронического нейродегенеративного состояния, при котором слияние, приспособленность и/или транспорт митохондрий является/являются нарушенными; заболевания или нарушения, ассоциированного с дисфункцией митофузина 1 (MFN1) или митофузина 2 (MFN2); заболевания, ассоциированного с фрагментацией, дисфункцией и/или нарушением подвижности митохондрий; дегенеративного нейромышечного состояния; болезни Шарко-Мари-Тута; бокового амиотрофического склероза; болезни Хантингтона; болезни Альцгеймера; болезни Паркинсона; наследственной моторно-сенсорной нейропатии; аутизма; аутосомно-доминантной атрофии зрительного нерва (ADOA); мышечной дистрофии; болезни Лу Герига; рака; митохондриальной миопатии; сахарного диабета и глухоты (DAD); наследственной оптической нейропатии Лебера (LHON); синдрома Лея; подострой склерозирующей энцефалопатии; нейропатии, атаксии, пигментного ретинита и птоза (NARP); мионейрогенной желудочно-кишечной энцефалопатии (MNGIE); миоклонической эпилепсии с рваными мышечными волокнами (MERRF); митохондриальной миопатии, энцефаломиопатии, лактатацидоза и инсультоподобных симптомов (MELAS); истощения мтДНК; митохондриальной нейрогастроинтестинальной энцефаломиопатии (MNGIE); дизавтономной митохондриальной миопатии; митохондриальной каналопатии; дефицита пируватдегидрогеназного комплекса (PDCD/PDH); диабетической нейропатии; периферической нейропатии, индуцированной химиотерапией; повреждения с размождением тканей; повреждения спинного мозга (SCI); травматического

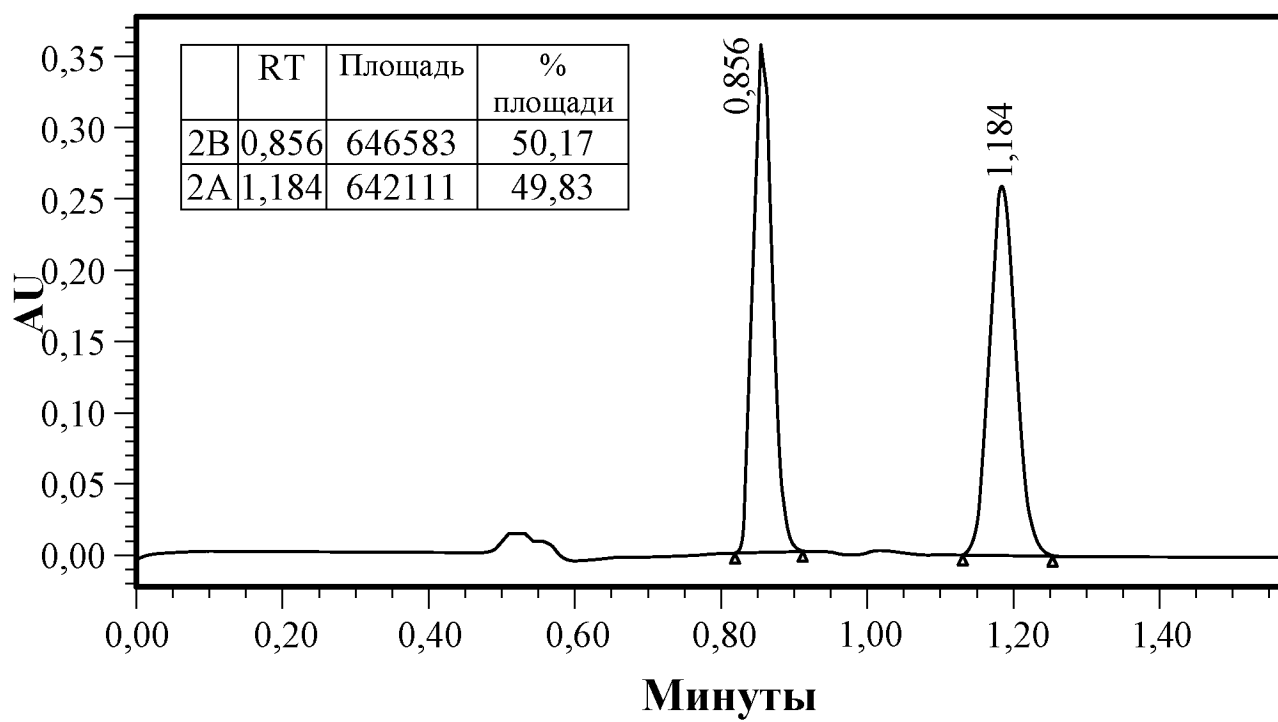
повреждения головного мозга; инсульта; повреждения зрительного нерва; состояний, которые предусматривают разъединение аксонов; и любой их комбинации.

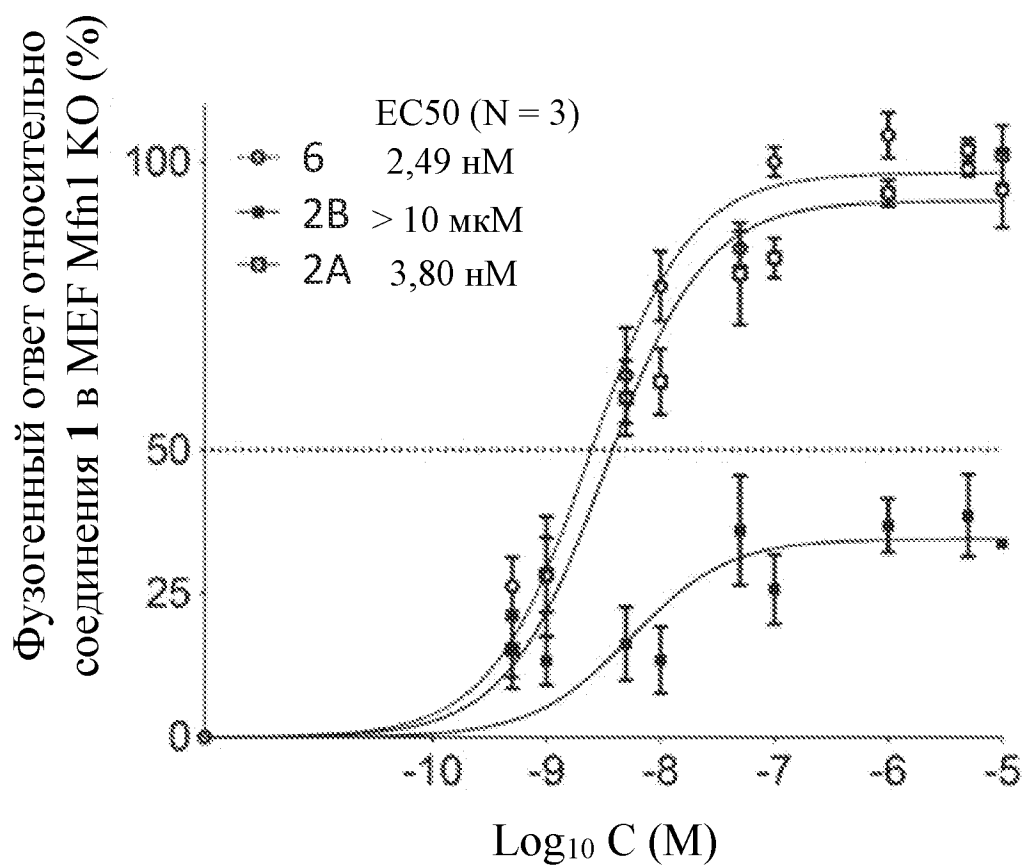
27. Способ активации митофузина у субъекта, включающий введение соединения или фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов.

28. Соединение или фармацевтическая композиция по любому из предыдущих пунктов для применения в активации митофузина у субъекта.

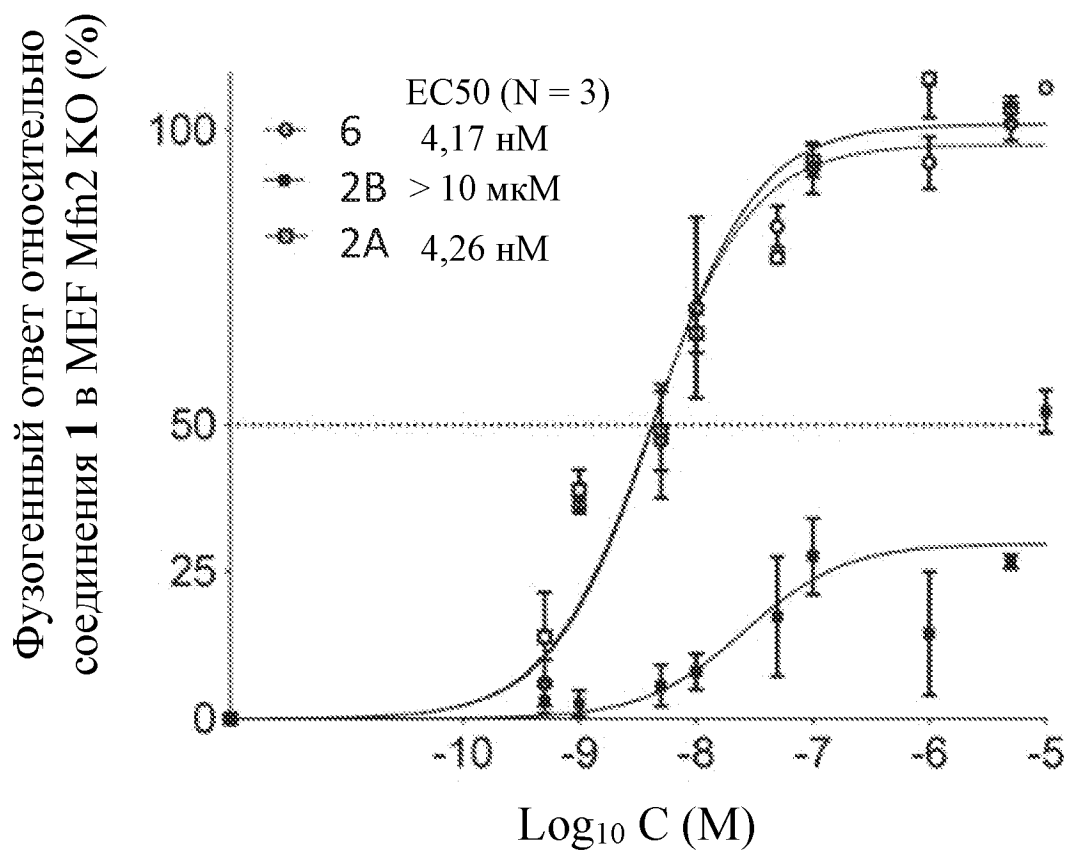
29. Применение соединения или фармацевтической композиции по любому из предыдущих пунктов в изготовлении лекарственного препарата для активации митофузина у субъекта.

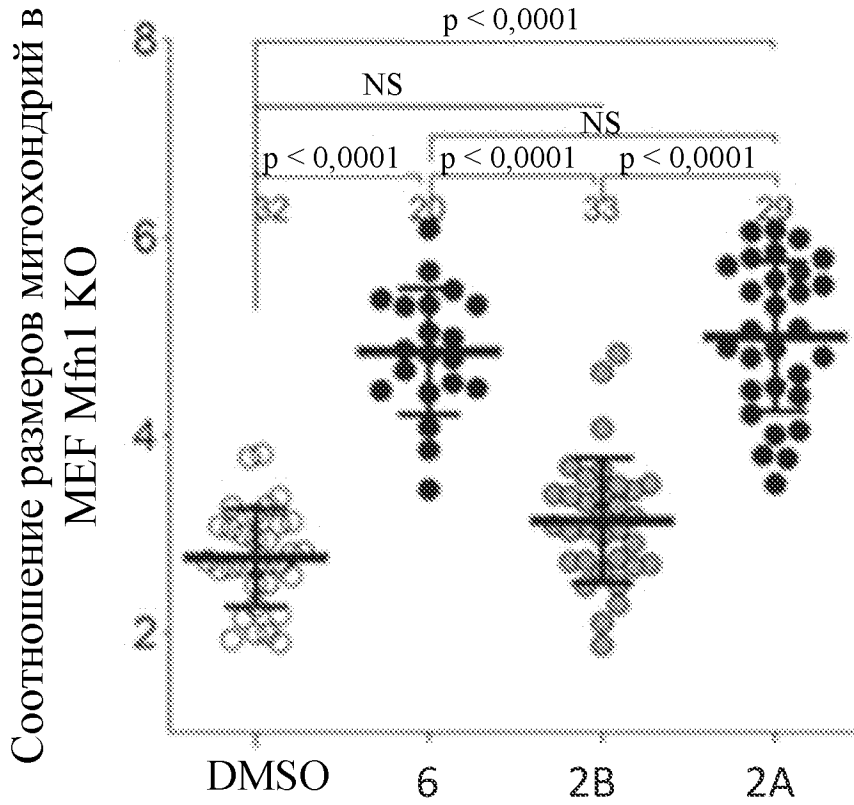
30. Способ, соединение, фармацевтическая композиция или применение по любому из предыдущих пунктов, где субъект является человеком.

**ФИГ. 1**

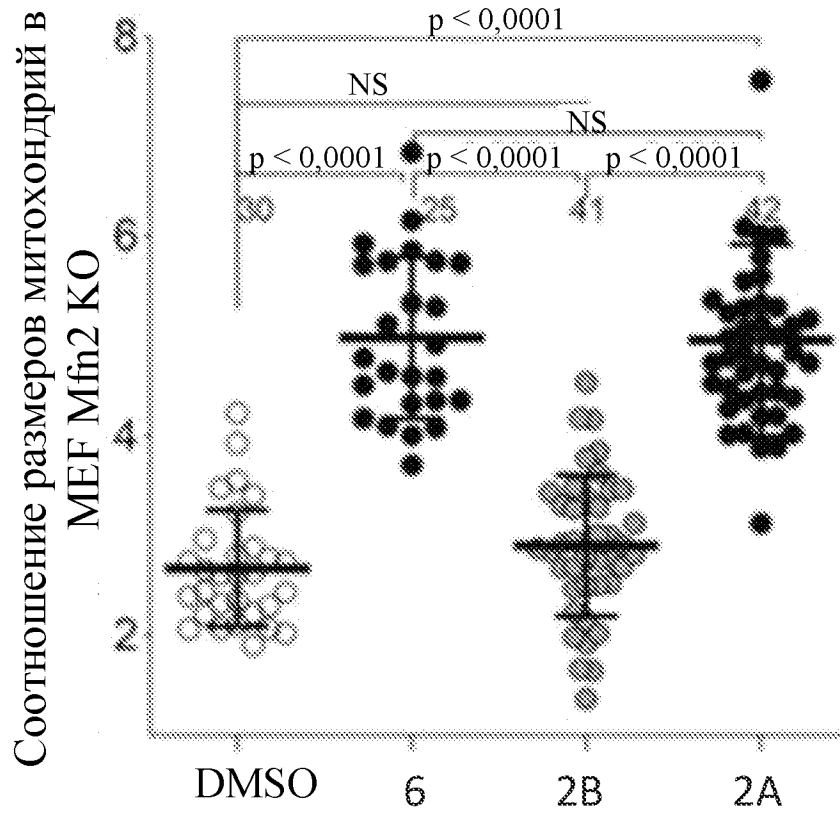


ФИГ. 2А

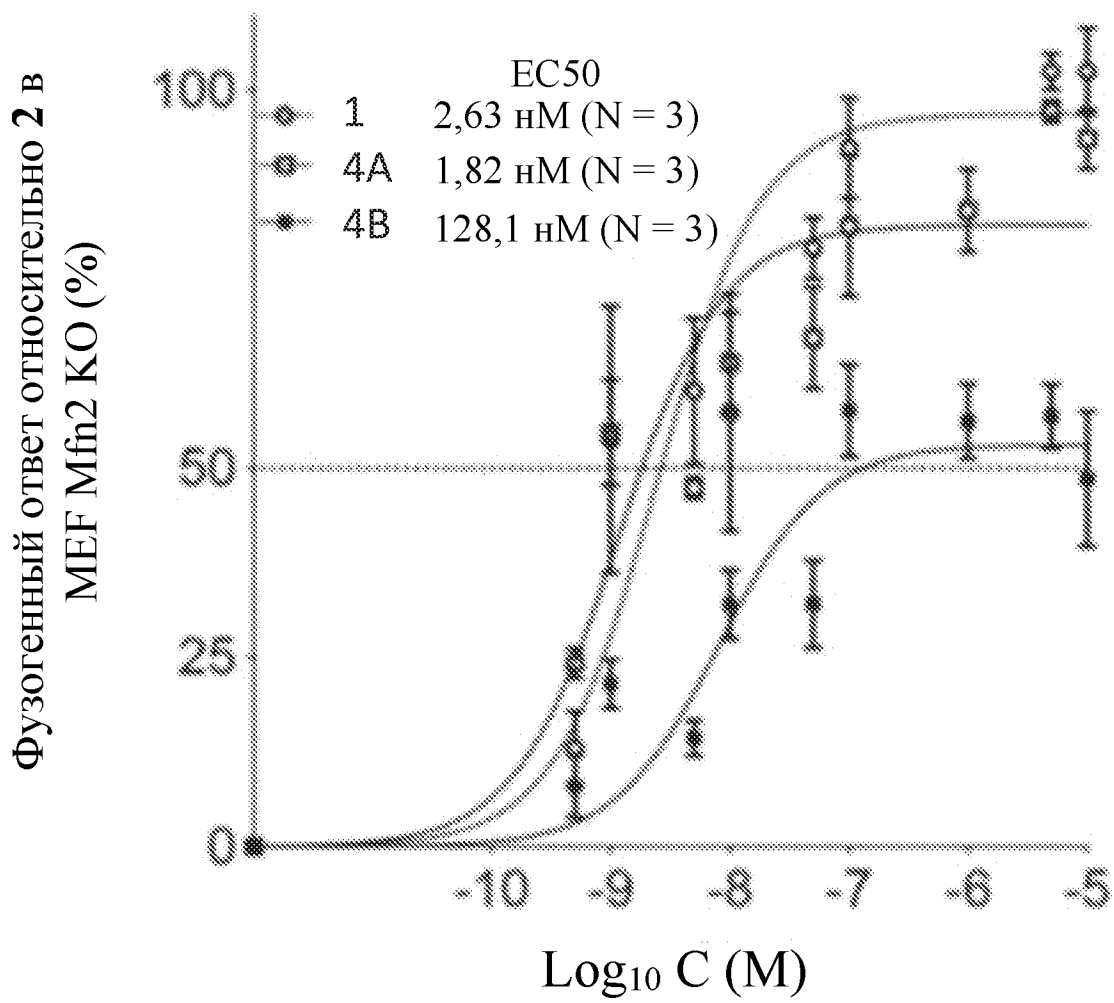
**ФИГ. 2В**



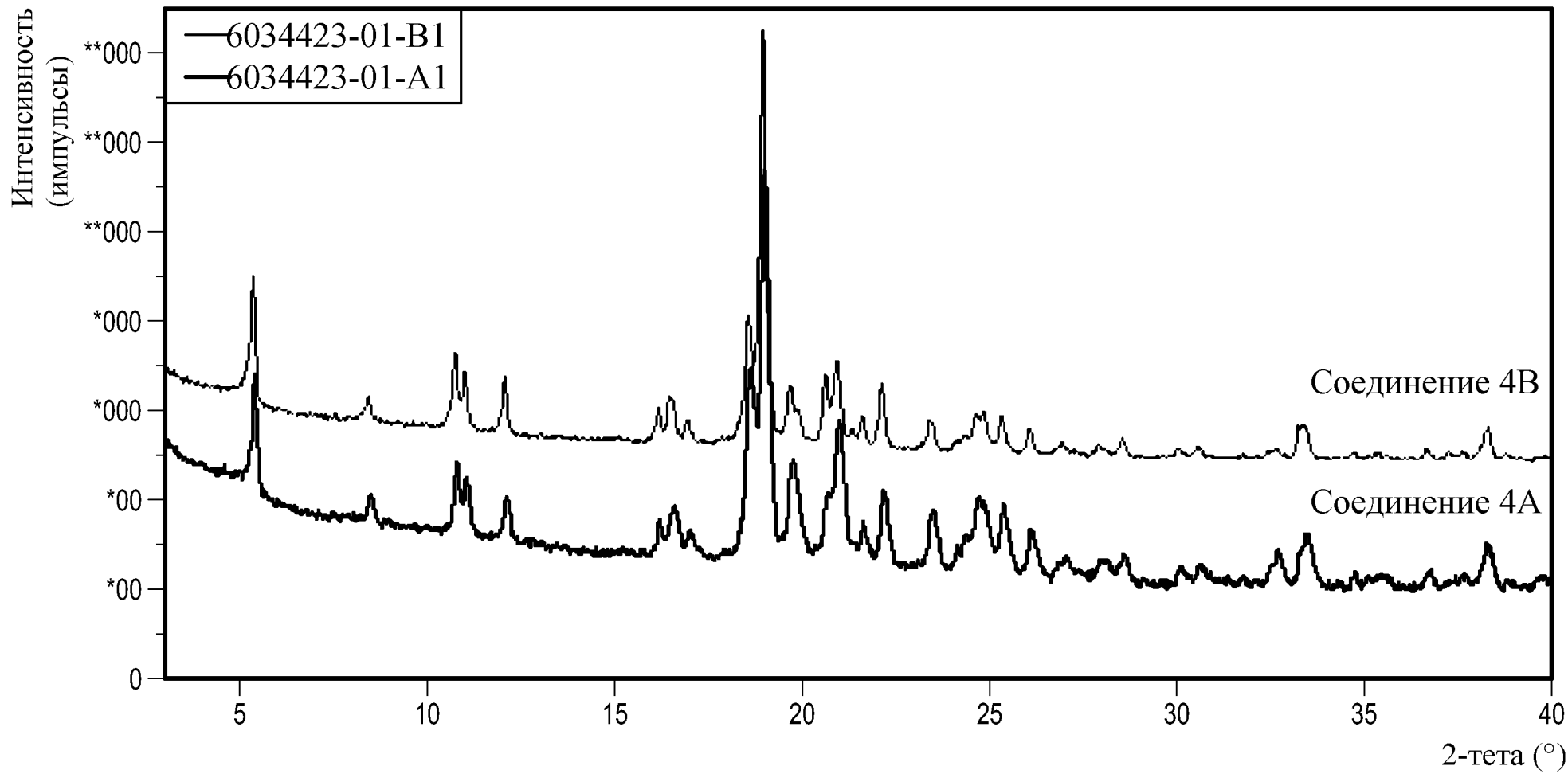
ФИГ. 3А



ФИГ. 3В

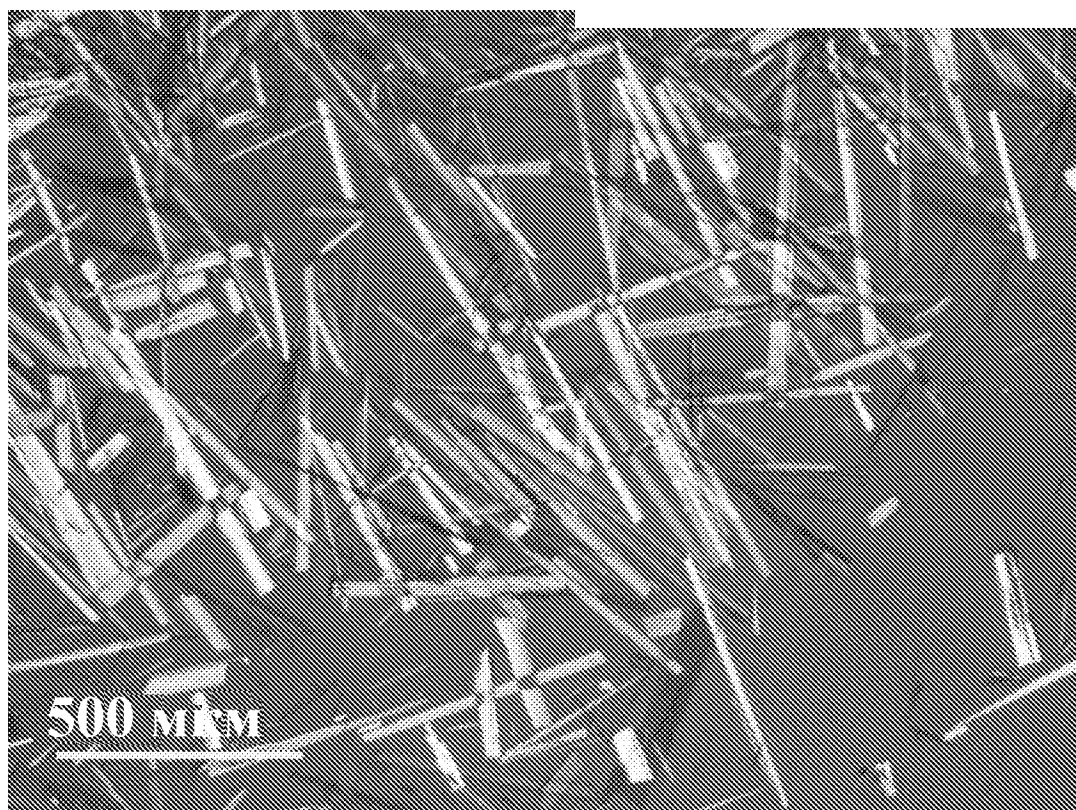


ФИГ. 4

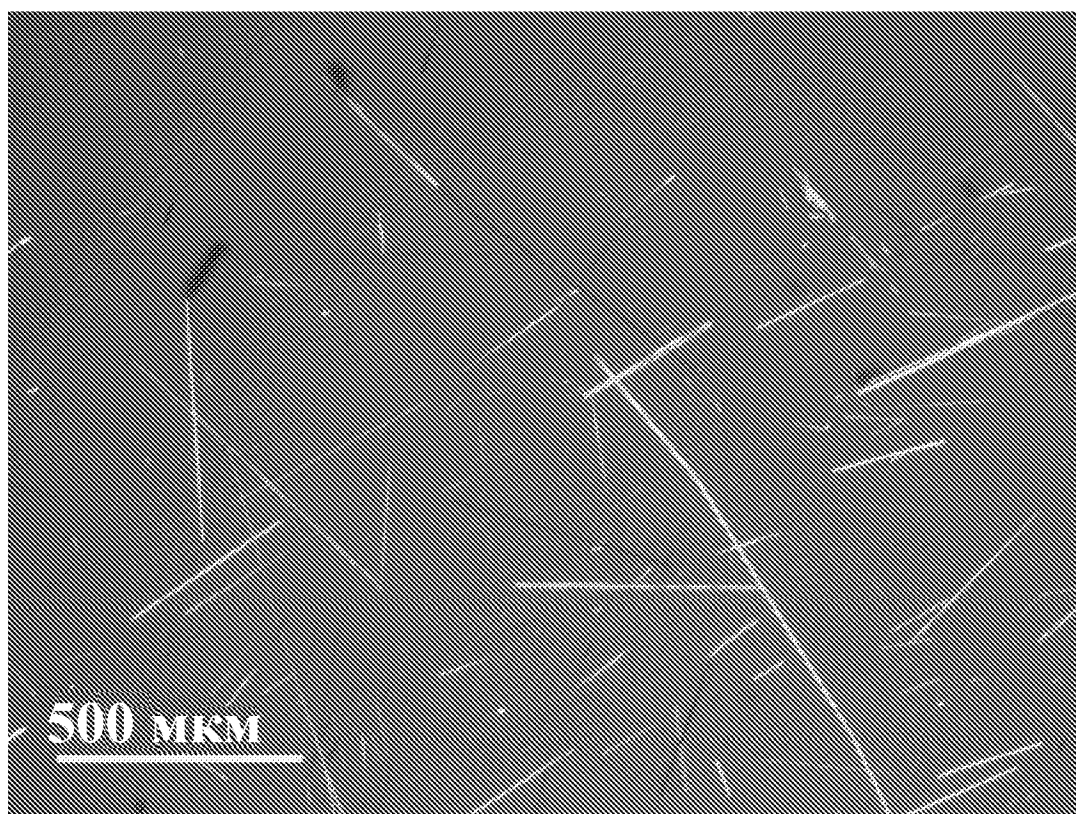


6/22

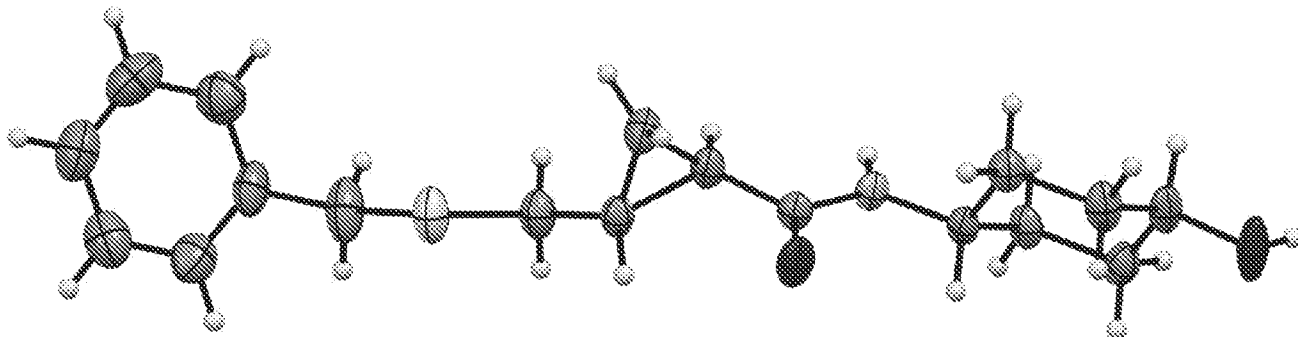
ФИГ. 5



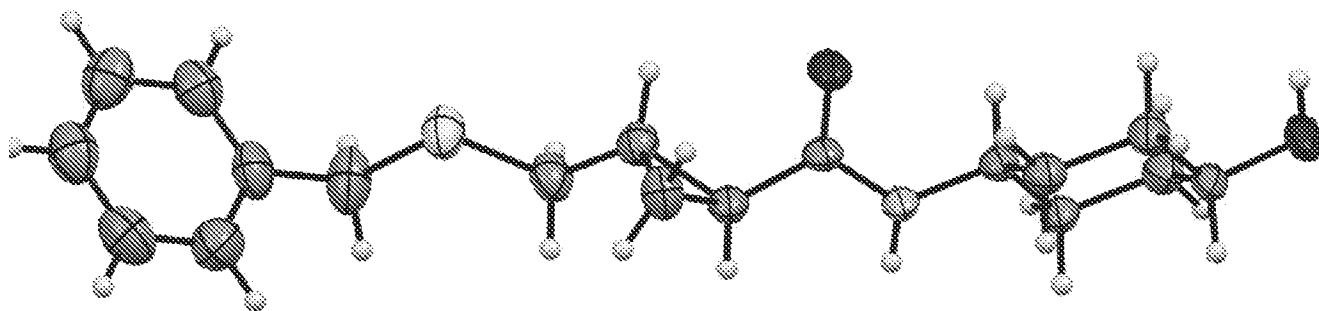
ФИГ. 6А



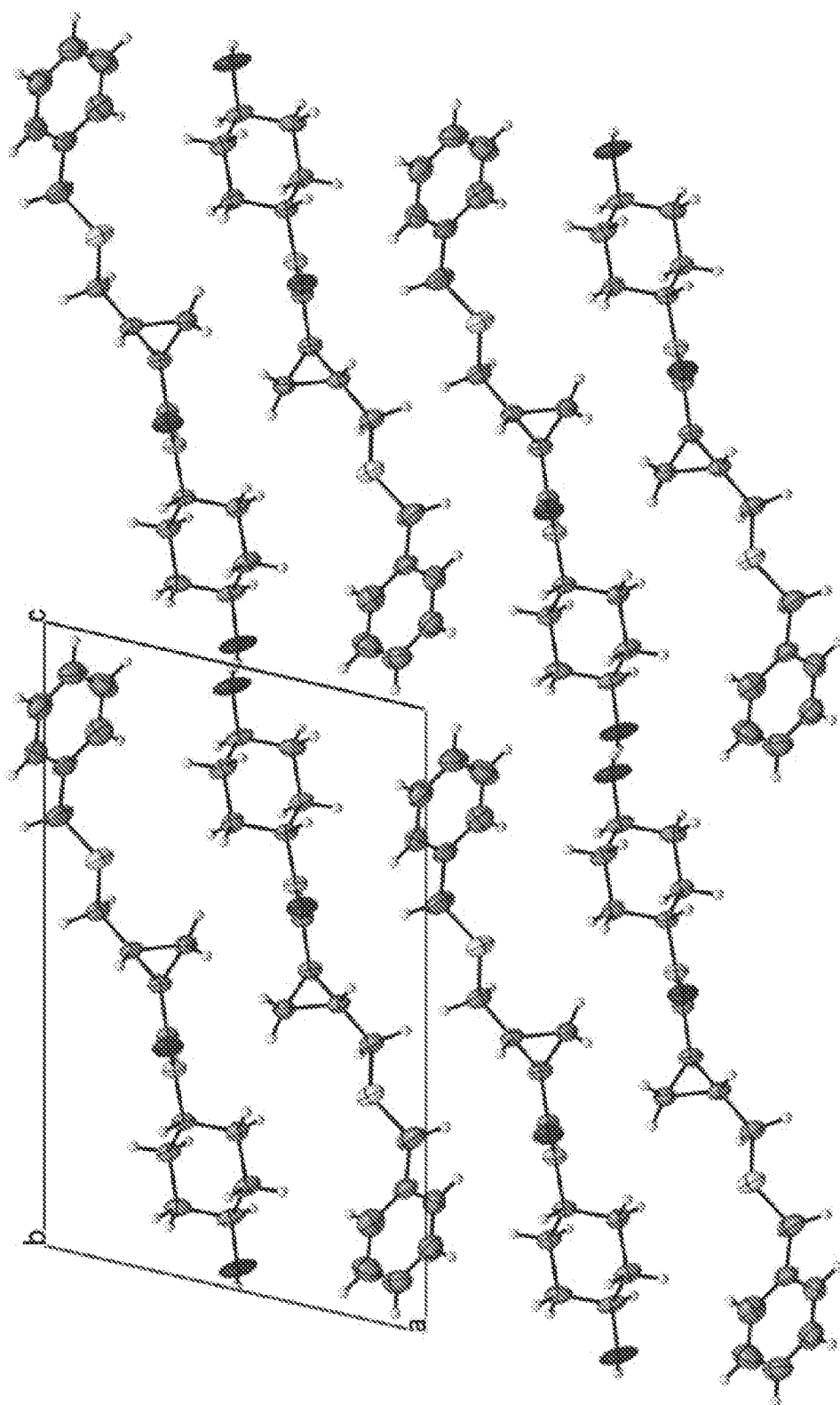
ФИГ. 6В



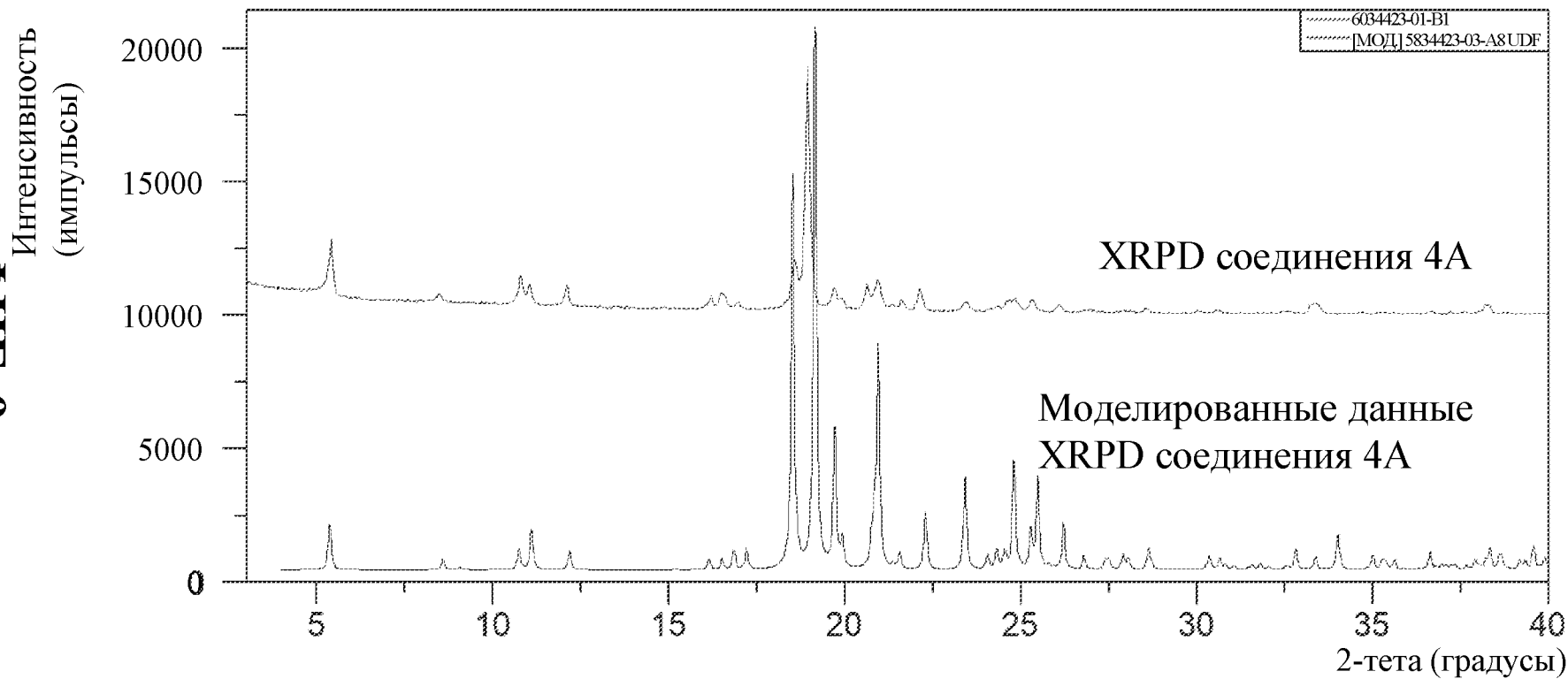
ФИГ. 7А

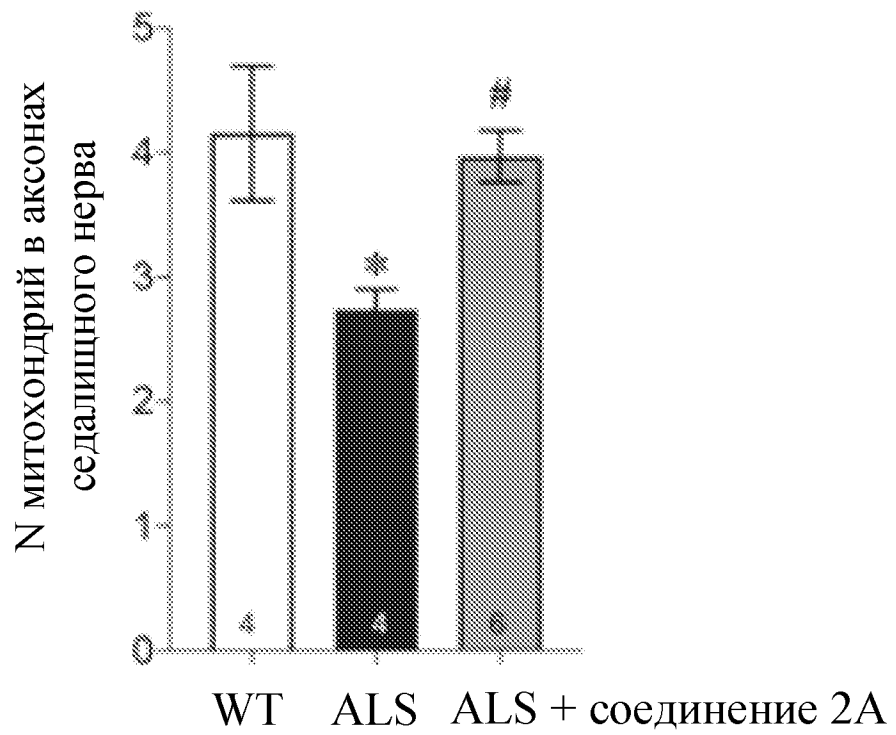
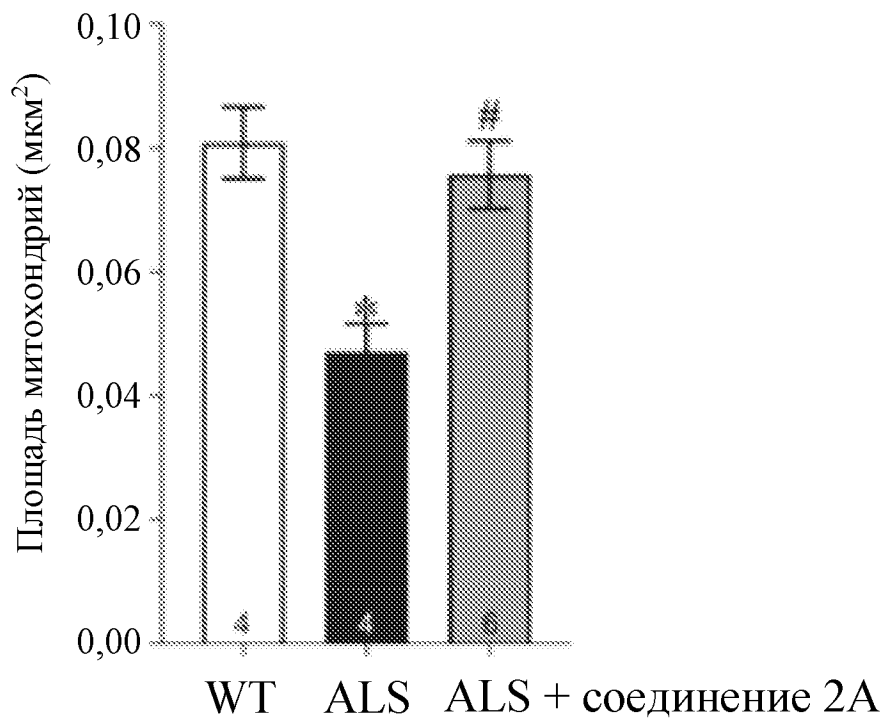


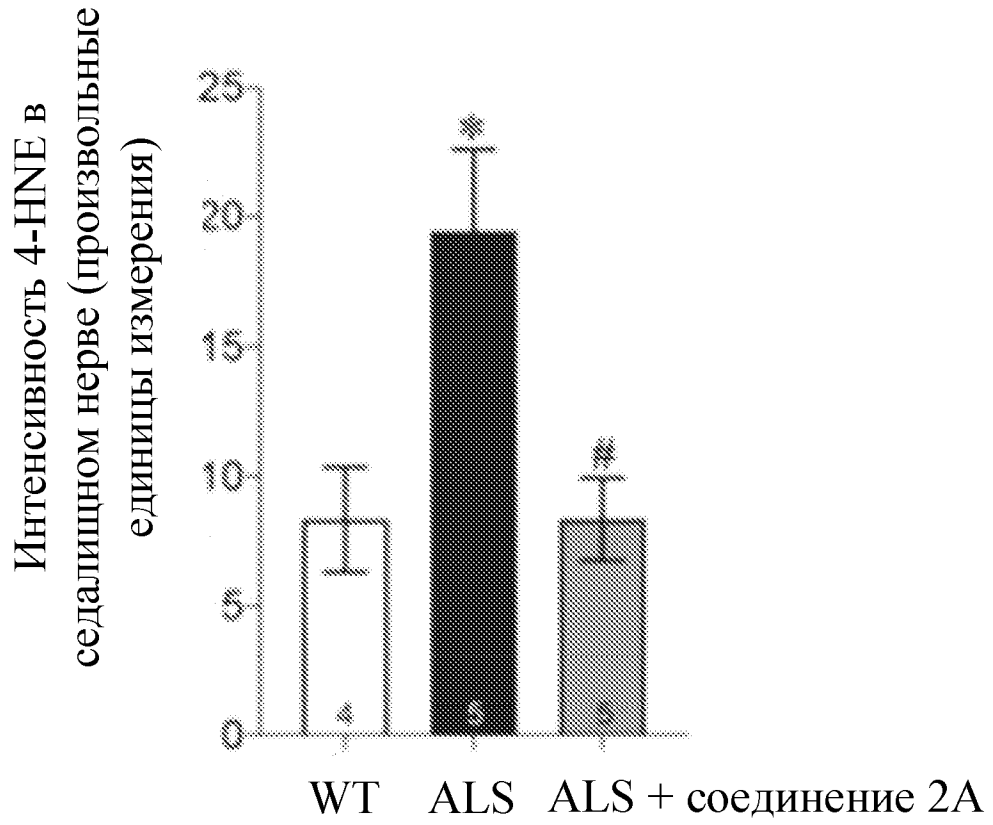
ФИГ. 7В

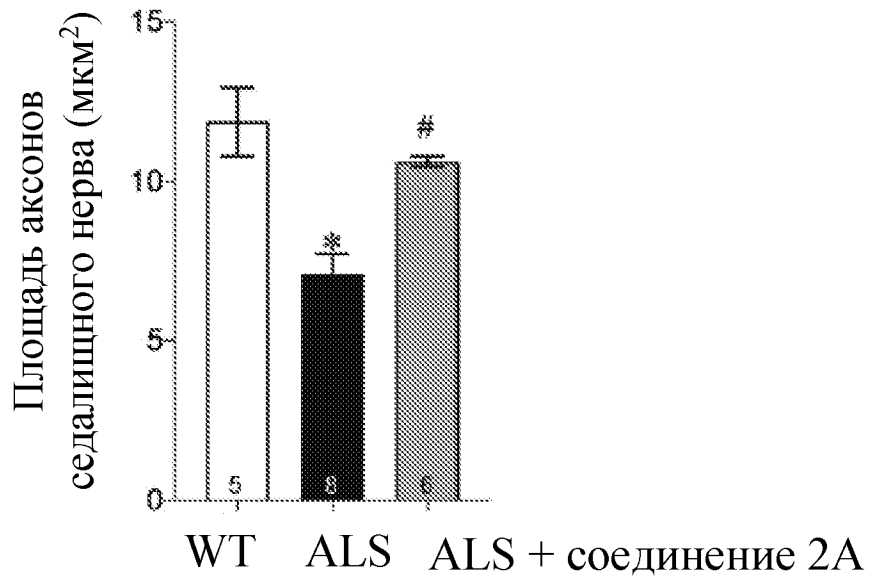
**ФИГ. 8**

Фиг. 9

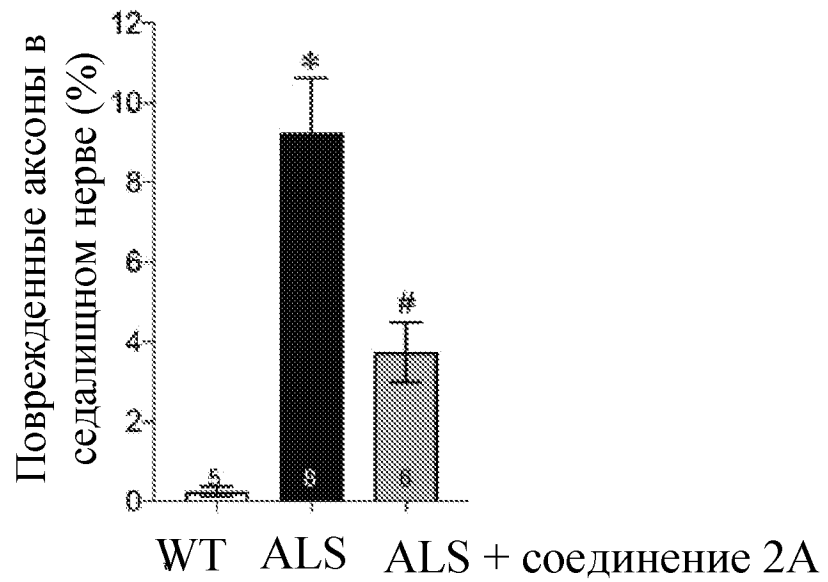


**ФИГ. 10А****ФИГ. 10В**

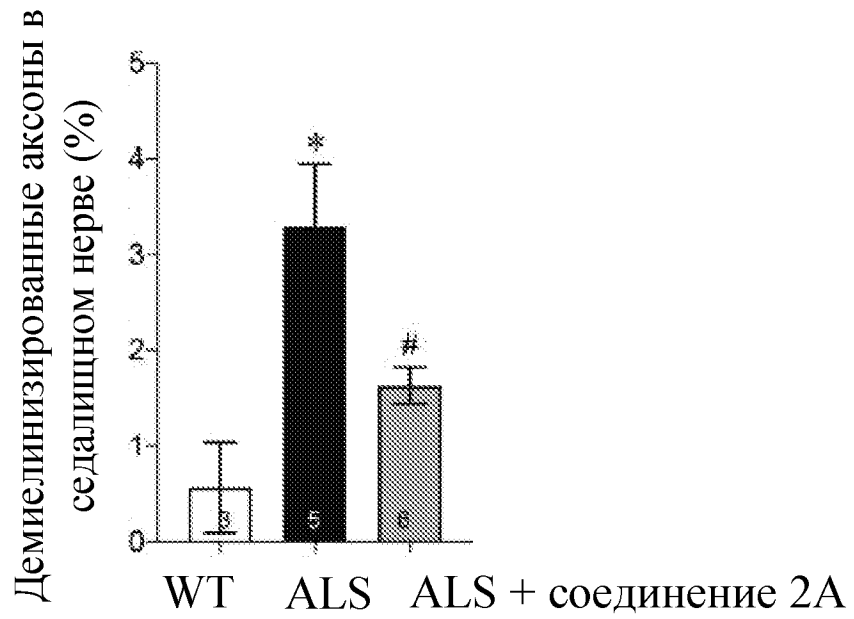
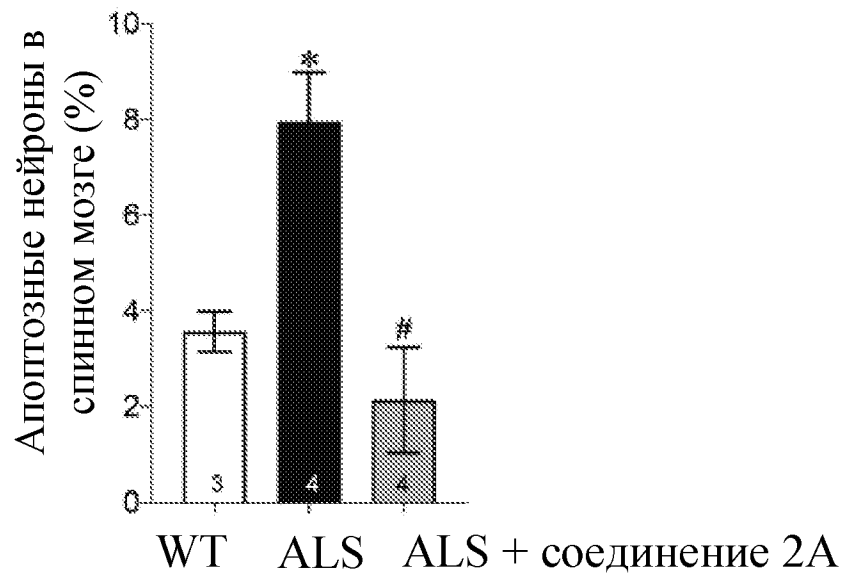
**ФИГ. 10С**

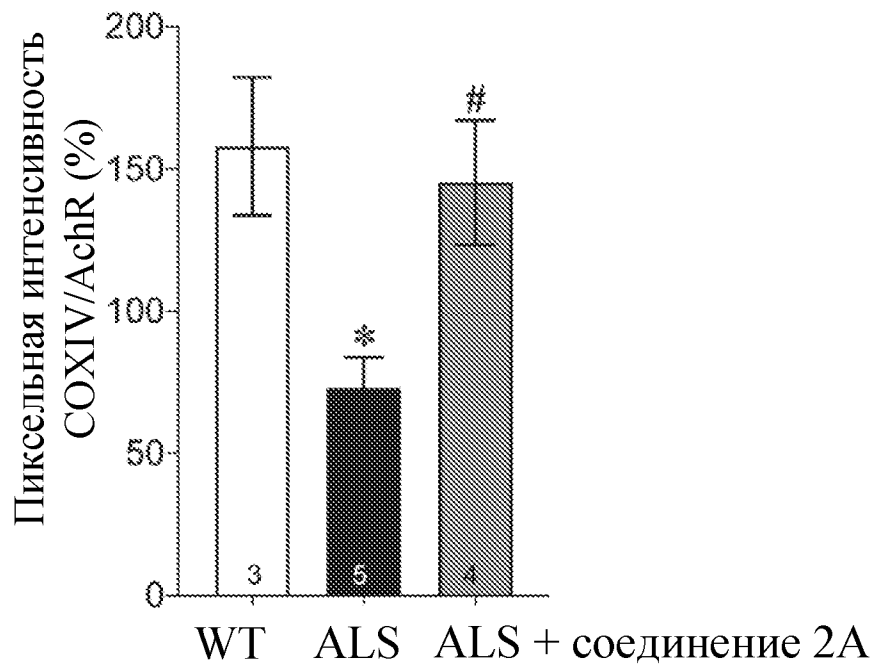
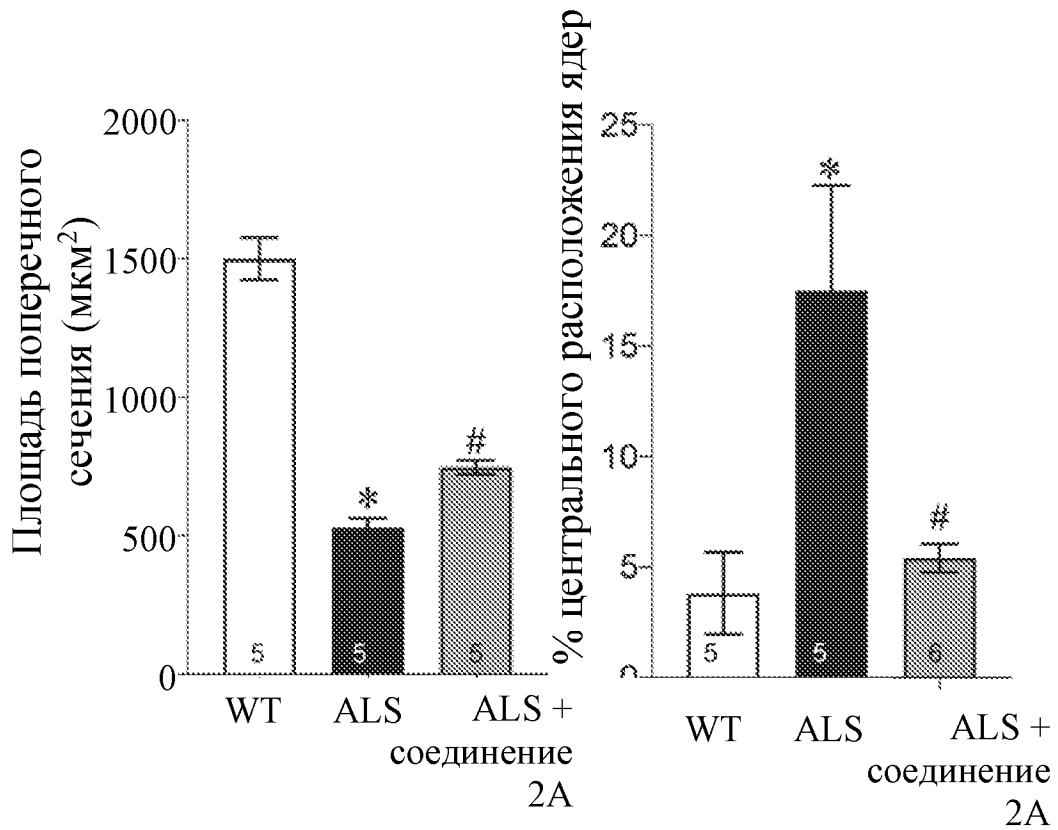


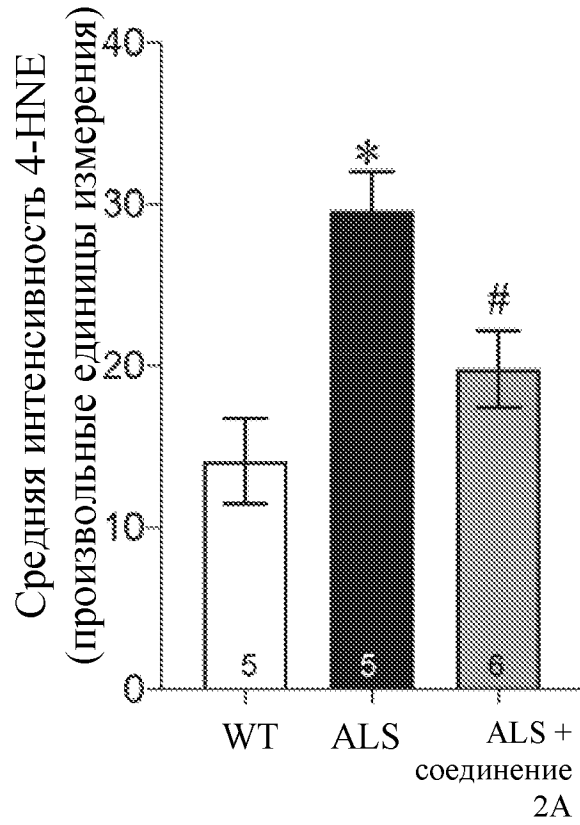
ФИГ. 11А



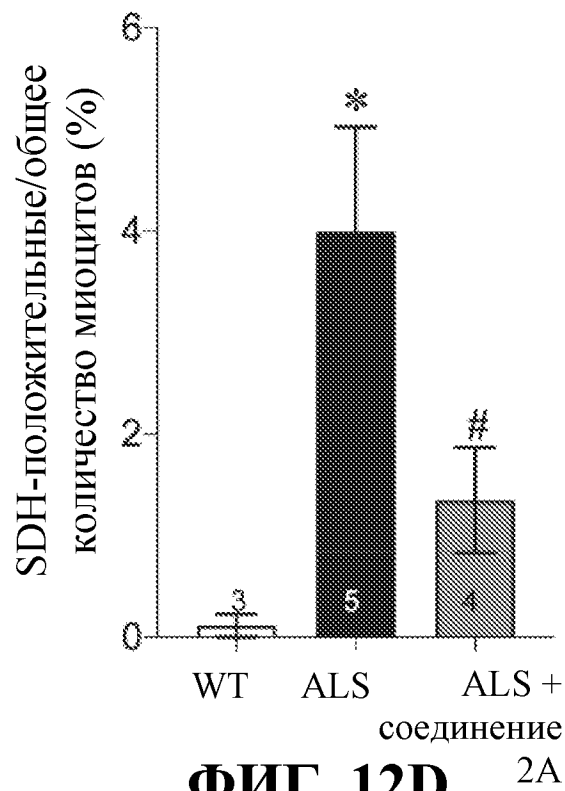
ФИГ. 11В

**ФИГ. 11С****ФИГ. 11D**

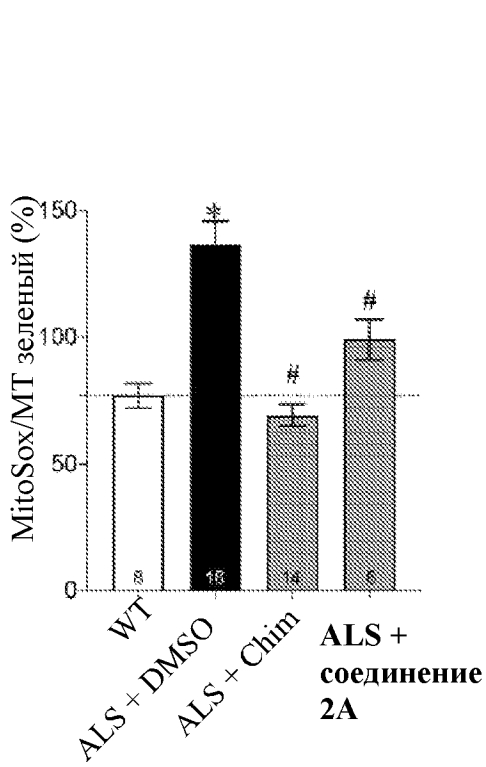
**ФИГ. 12А****ФИГ. 12В**



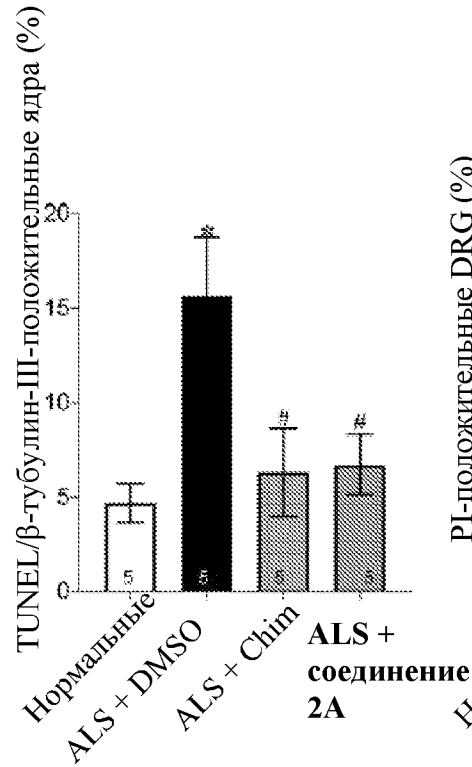
ФИГ. 12С



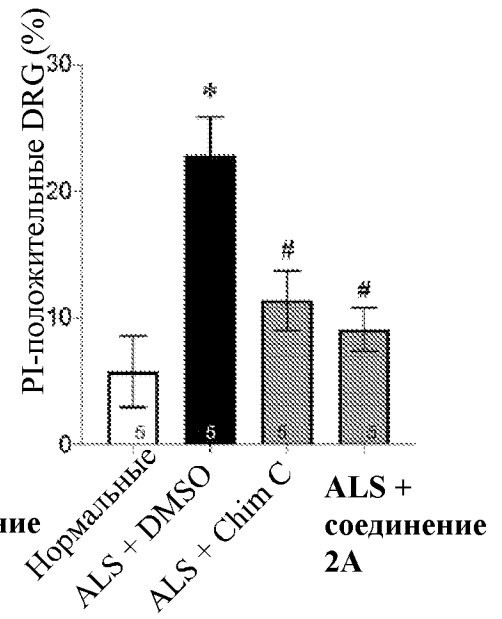
ФИГ. 12D



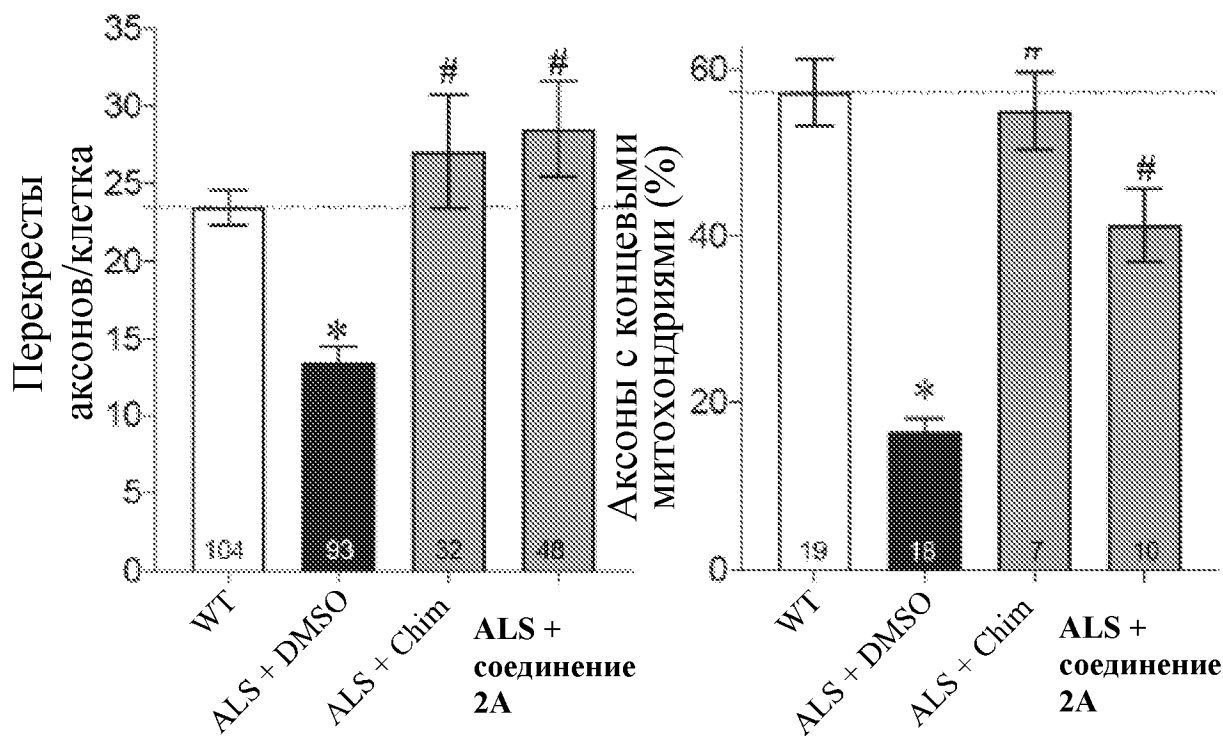
ФИГ. 13А



ФИГ. 13В

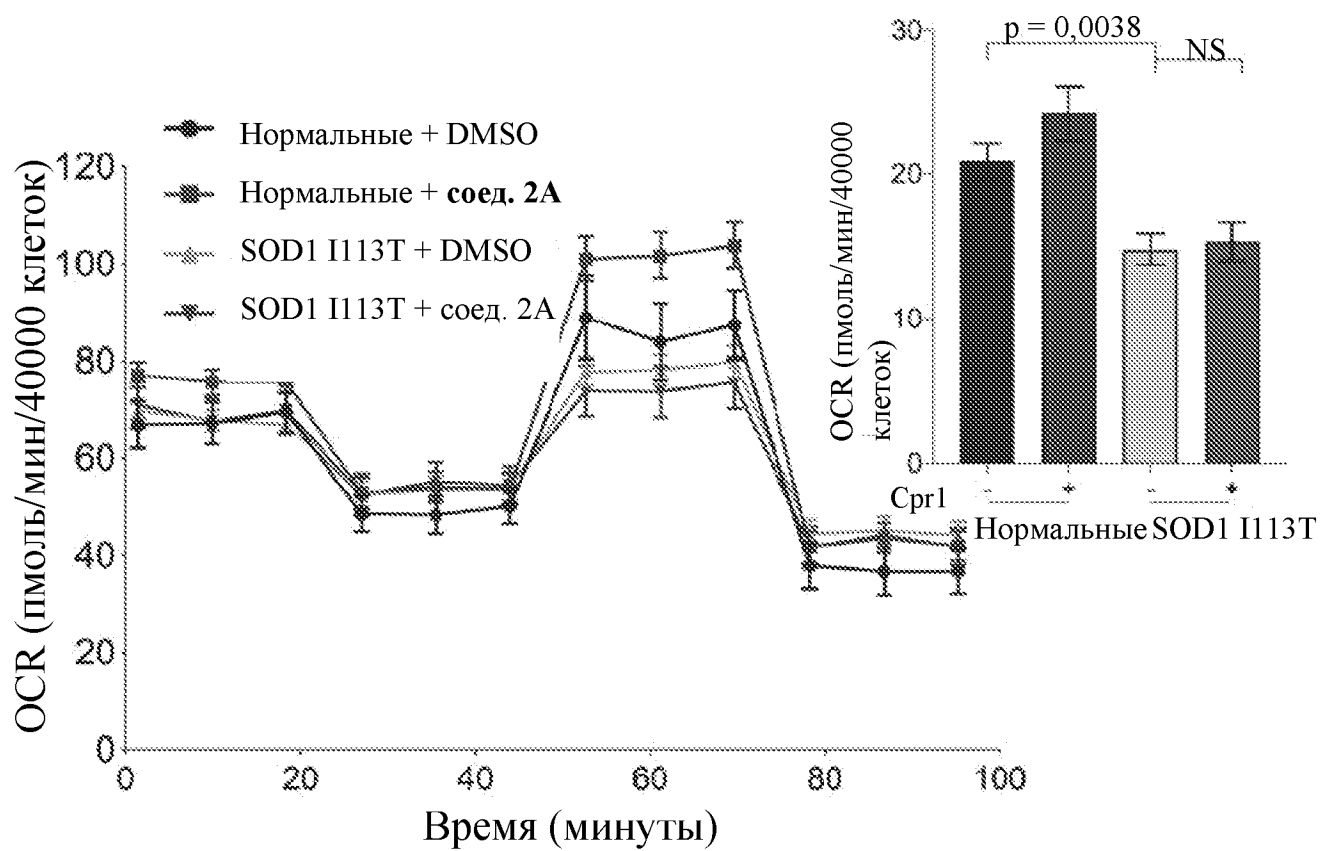


ФИГ. 13С

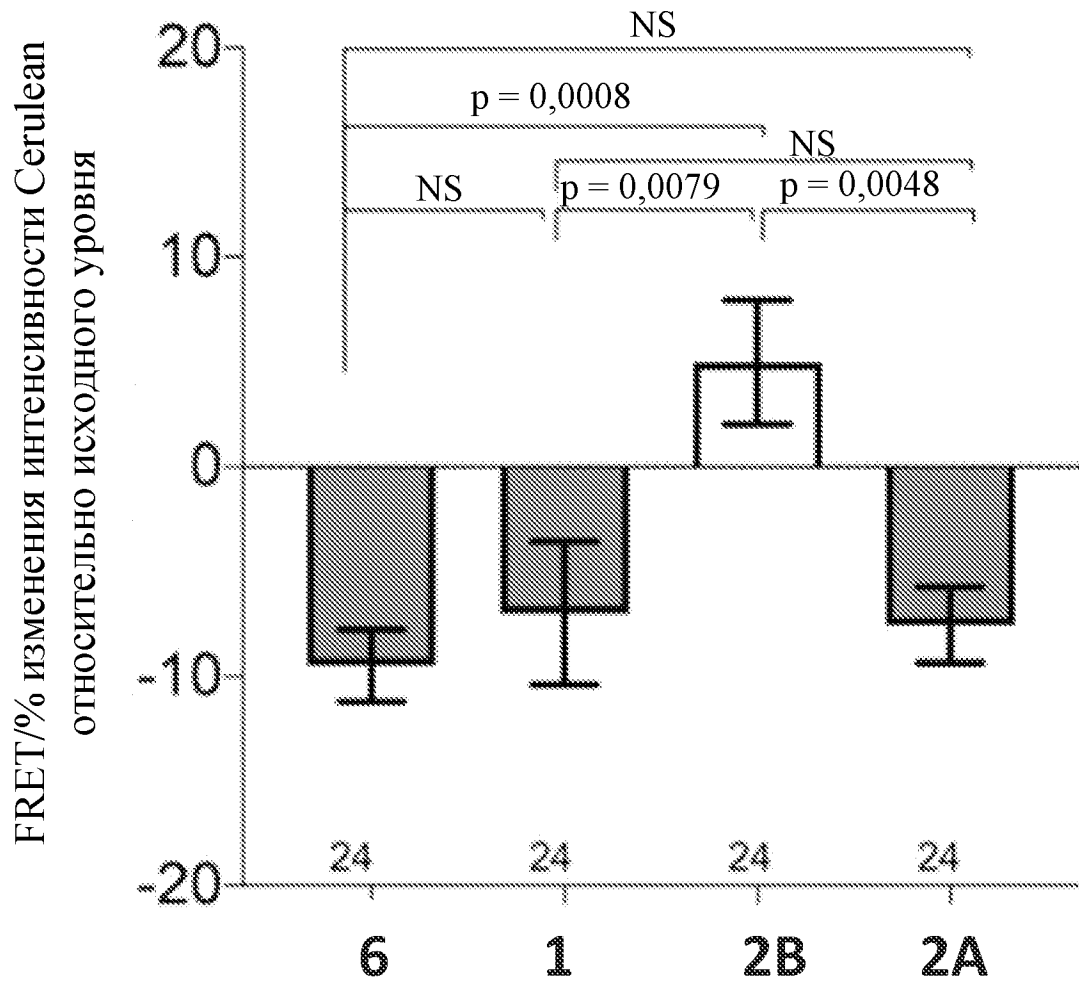


ФИГ. 13D

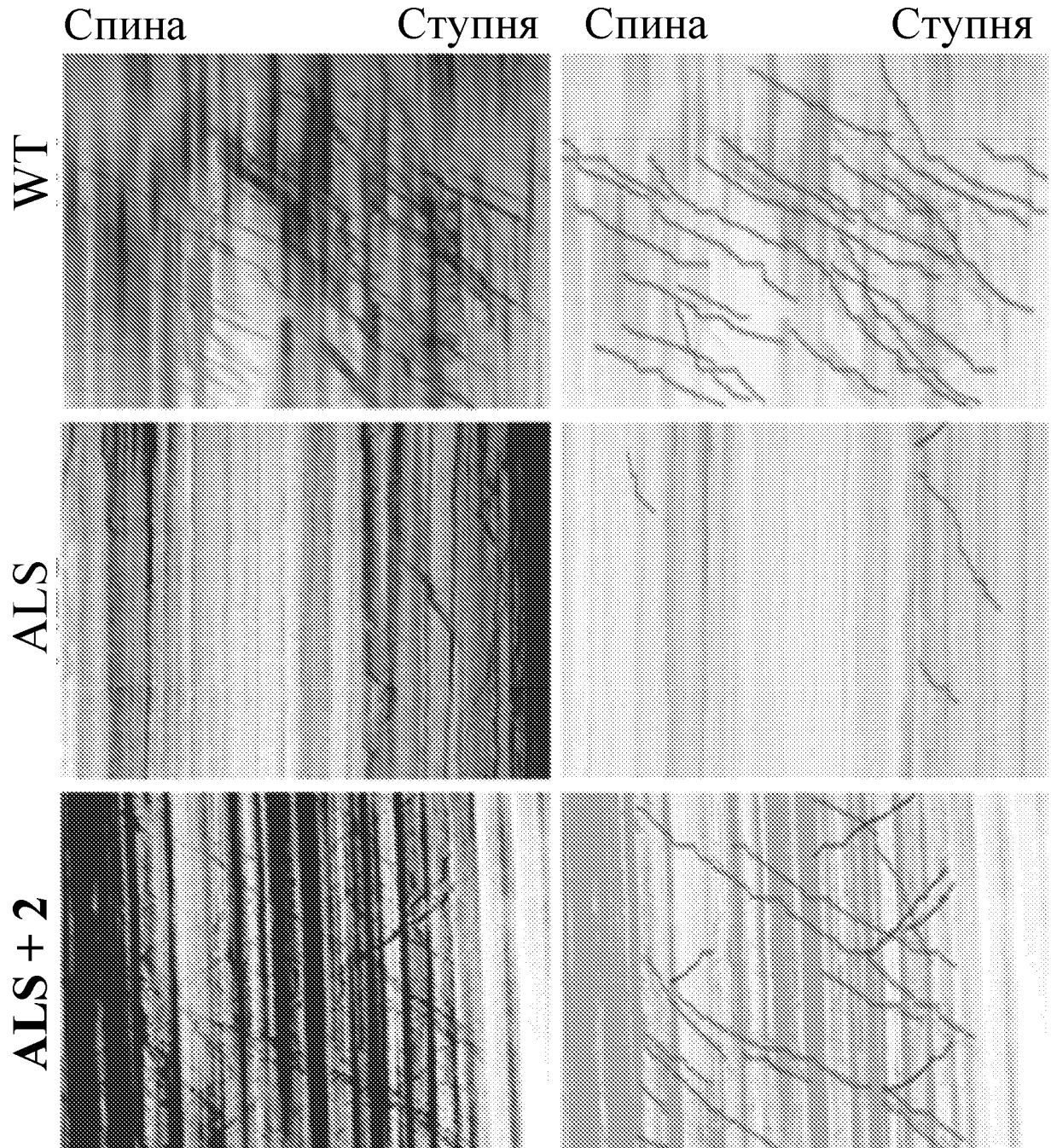
ФИГ. 13E



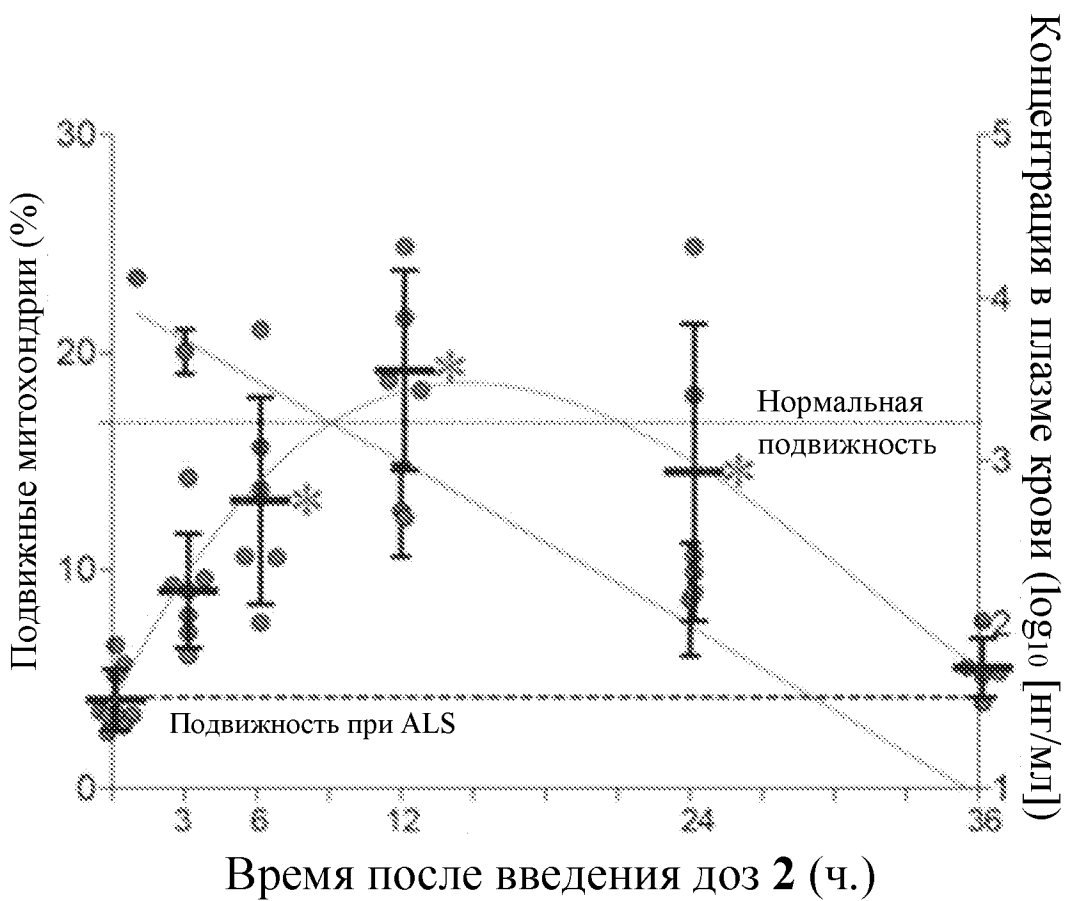
ФИГ. 13F



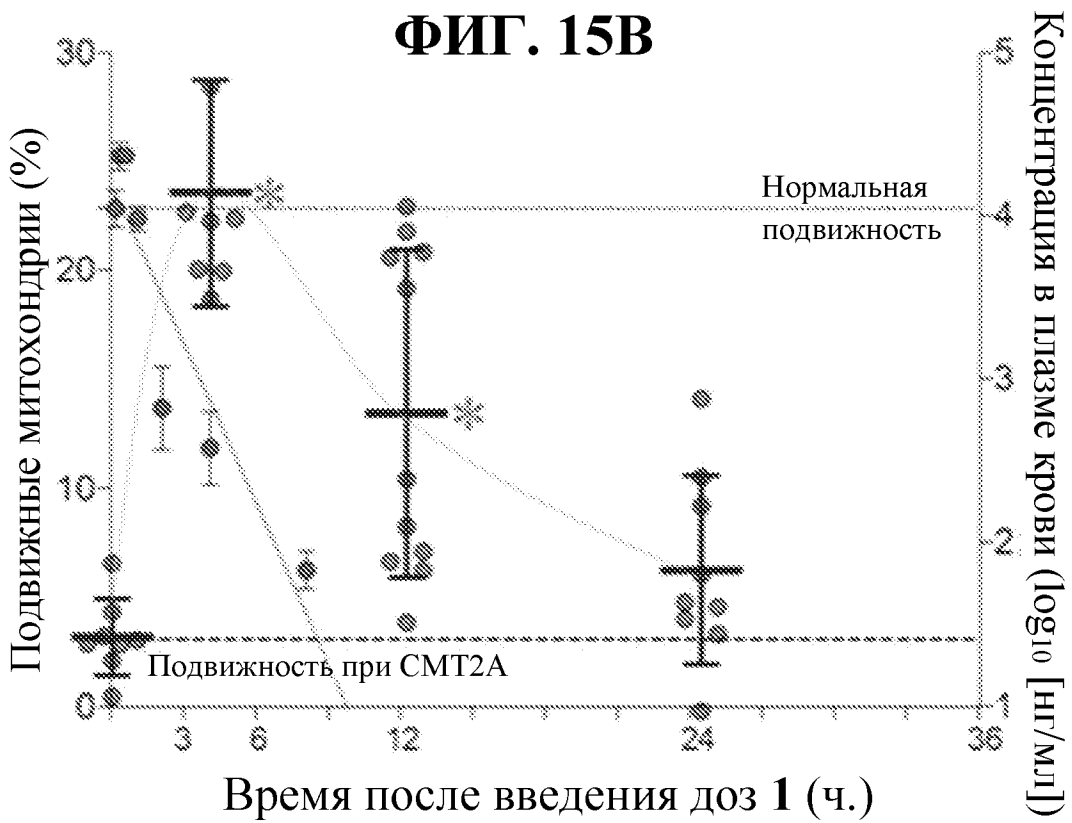
ФИГ. 14



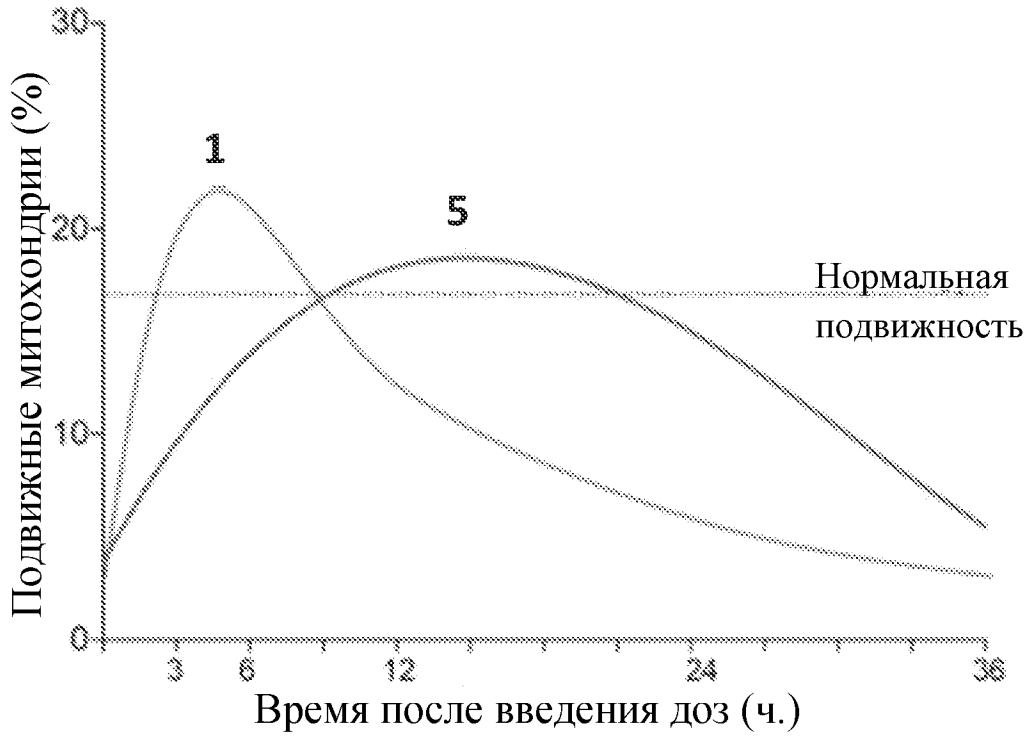
ФИГ. 15А



ФИГ. 15В

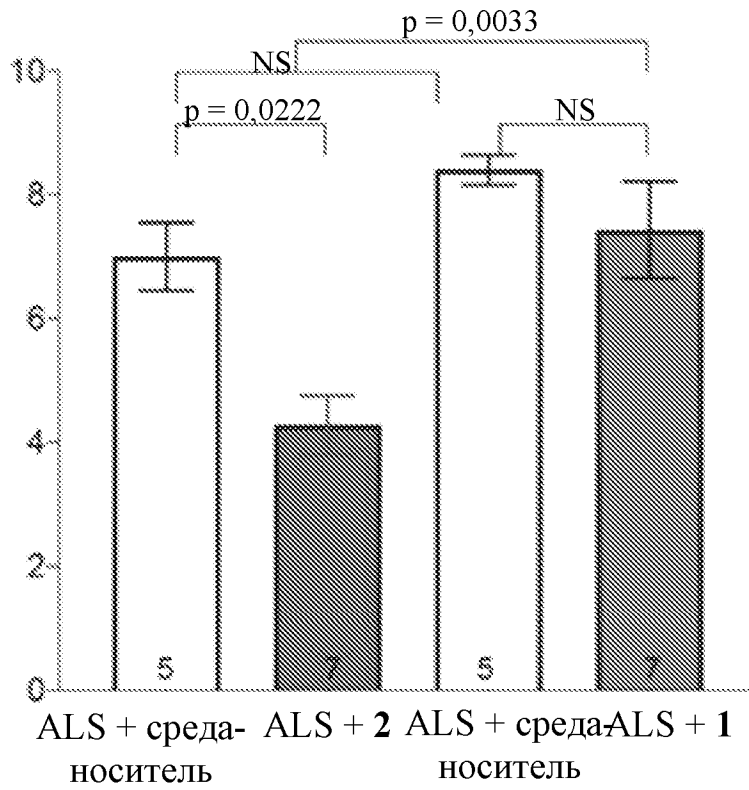


ФИГ. 15С



ФИГ. 15D

Комбинированный балл дисфункции (тест ходьбы по перекладине, тест схватывания задними конечностями, анализ походки, кифоз) через 140 дней



ФИГ. 15E